

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-500724

(43) 公表日 平成8年(1996)1月30日

(51) Int.Cl.⁸

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/09

識別記号

庁内整理番号

F I

A 9453-4B

9281-4B

C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願平5-519892
(86) (22) 出願日 平成5年(1993)5月12日
(85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)11月11日
(86) 国際出願番号 PCT/EP93/01203
(87) 国際公開番号 WO93/23562
(87) 国際公開日 平成5年(1993)11月25日
(31) 優先権主張番号 9210176.5
(32) 優先日 1992年5月12日
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, NO, US

(71) 出願人 セミュ・バイオテクニク・アーベー
スウェーデン国、エス-752 37 アブサ
ラ、バイネルガータン 21
(72) 発明者 ユーレン、マチアス
スウェーデン国、エス-752 39 アブサ
ラ、クバーンボーガータン 30
(72) 発明者 ルンデバーク、ジョアキム
スウェーデン国、エス-114 25 ストッ
クホルム、クングステンガータン 3
(74) 代理人 弁理士 山崎 行造 (外2名)

(54) 【発明の名称】 DNA配列の解析のための化学的方法

(57) 【要約】

本発明は、DNA配列のある標的位置の塩基を同定する方法にして、試料DNAを増幅処理に付し、その増幅DNAを固定化した後で二本鎖解離処理に付して、標的位置の直ぐ隣にハイブリダイズするような伸長プライマーから非固定鎖を取り除いておき、固定化された一本鎖DNAの4つのアリコート各々を1種類のジデオキシヌクレオチド存在下でのポリメラーゼ反応に付し、その際、各アリコートについて異なるジデオキシヌクレオチドを用いて標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドだけが組込まれるようにしておき、次に、4つのアリコートを4種類すべてのデオキシヌクレオチドの存在下での伸長反応に付して、各アリコート中においてジデオキシヌクレオチドと反応していないDNAが伸長して二本鎖DNAを形成する一方で、ジデオキシヌクレオチドでブロックされたDNAは非伸長鎖DNAとして残るようにしておき、しかる後に、二本鎖及び/又は非伸長鎖DNAの同定を行なって、どのジデオキシヌクレオチドが導入されているのかを明らかにすることを特徴とする方

法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. DNA配列のある標的位置の塩基を同定する方法にして、試料DNAを増幅処理に付し、その増幅DNAを固定化した後で二本鎖解離処理に付して、標的位置の直ぐ隣にハイブリダイズするような伸長プライマーから非固定化鎖を取り除いておき、固定化された一本鎖DNAの4つのアリコートの各々を1種類のジデオキシヌクレオチド存在下でのポリメラーゼ反応に付し、その際、各アリコートについて異なるジデオキシヌクレオチドを用いて標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドだけが組込まれるようにしておき、次に、4つのアリコートを4種類すべてのデオキシヌクレオチドの存在下での伸長反応に付して、各アリコート中においてジデオキシヌクレオチドと反応していないDNAが伸長して二本鎖DNAを形成する一方で、ジデオキシヌクレオチドでブロックされたDNAは非伸長鎖DNAとして残るようにしておき、しかる後に、二本鎖及び／又は非伸長鎖DNAの同定を行なって、どのジデオキシヌクレオチドが導入されていて、したがってどの塩基が標的位置に存在しているのかを明らかにすることを特徴とする方法

2. 請求項1記載の方法にして、固定化されているか或いは固定化用手段の備わっている第一のプライマーを用いるインヴィトロ増幅反応によって、試料DNAを増幅することを特徴とする方法。

3. 請求項2記載の方法にして、前記第一プライマーが、標識保有DNA結合タンパク質に対する認識部位を二本鎖形のときに含んでいる領域を有していて、鎖伸長反応による二本鎖DNAの形成を上記標識タンパク質への結合によって同定することを特徴とする方法。

4. 請求項2又は請求項3記載の方法にして、前記第一プライマーが固定化用手段としてビオチンを有することを特徴とする方法。

5. 請求項2乃至請求項4のいずれか1項記載の方法にして、前記インヴィトロ増幅に、前記標的DNAの3'末端側の領域A及び／又はその領域Aからさらに3'側に伸びた領域Bにハイブリダイズする第二のプライマーであって、上記標的配列のA及び／又はBの少なくとも一部分にハイブリダイズする3'末端配列を有していてかつその5'末端にはAと実質的に同一の配列を有する第

二のプライマーを使用し、この増幅処理によって、標的配列の3'末端に、領域Aとループを形成し得る領域と配列Aに相補的な領域A'とを以上の順序で有する二本鎖標的DNAを生じさせ、しかる後に、増幅二本鎖DNAを固定化形で二本鎖解離処理に付して、そうすることによって固定化されていない標的鎖を遊離させて、領域A'を領域Aに自然に或いは人為的にハイブリダイズさせてループを形成させることを特徴とする方法。

6. 請求項1乃至請求項5のいずれか1項記載の方法にして、二本鎖DNAの形成を、鎖伸長反応中に放出されたピロリン酸の検出又は推計によって同定することを特徴とする方法。

7. 請求項6記載の方法にして、発光をピロリン酸のインジケーター又は指標とするルシフェリン/ルシフェラーゼ反応によってピロリン酸を検出又は推計することを特徴とする方法。

8. 請求項1記載の方法を実施するためのキットにして、少なくとも以下の構成成分：

(a) その検査に特異的な伸長プライマーであって、前記標的位置がそのプライマーの3'末端の直ぐ隣になるように試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマー；

(b) ポリメラーゼ；

(c) ジデオキシヌクレオチドとデオキシヌクレオチド；及び

(d) 任意成分としての固体担体

を含んでなることを特徴とするキット。

9. 請求項8記載のキットにして、さらに少なくとも以下の構成成分：

(i) 少なくとも一方のプライマーがそのプライマーを固定化するための手段を有している一対のPCR用プライマー；

(ii) ポリメラーゼ、好ましくはTaq1ポリメラーゼのような耐熱性のポリメラーゼ；

(iii) PCR反応用の緩衝液；及び

(iv) デオキシヌクレオチド

をも含んでいることを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

DNA配列の解析のための化学的方法

本発明は、DNA配列の標的位置にある塩基を同定するための新規方法に関する。

診断又は法廷用のDNA解析では、1個の塩基の変異やミスマッチを検出すれば必要な情報が得られるような場合に標的DNAを完全に配列決定する必要はない。このような1塩基変異やミスマッチは例えば点変異によって生ずることもあるし、遺伝物質の欠失や挿入によっても生ずるが、このような場合には配列中の最初の異常塩基を検出すれば診断に必要な情報が得られるであろう。こうした点から、対立遺伝子特異的PCR法が開発された。この方法では、標的DNAに対して一对のプライマー対を用いて試料のPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を行なうが、上記プライマー対の片方は比較的短くて標的DNAの一方の対立遺伝子座とはハイブリダイズするがもう一方の対立遺伝子配列とはハイブリダイズしない。したがって、増幅が起こらなければ、ハイブリッドを形成しない対立型のDNAが存在していることの指標となるが、残念ながら、正常なDNAに確実にハイブリダイズさせるために必要とされる諸条件を現実遂行することは困難である。

標的変異又は対立型変異領域から離れた位置にハイブリダイズするようなプローブを使用した後、突然変異領域又は対立型変異領域とはハイブリダイズしないような標識プローブを使用して、PCRを行なうことが提案されている。しかし、この方法も一般に偽陰性を与える。

対立遺伝子特異的DNAを検出するためのリガーゼ連鎖反応（LCR）と呼ばれる方法が最近開発されており、バラングによって概説されている（F.Barang, PCR Methods and Applications Vol.1,5-16）。この方法では、相補DNA上で互いに隣接してハイブリダイズするような2つの異なるオリゴヌクレオチドが必要であり、結果を判定する前にLCR生成物をポリアクリルアミドゲル上で分離する必要がある。

完全に配列を決定する方法、特にWO89/09282に記載されているような固相配列決定法は正確な結果を与えるが、もっと多大な労力を必要とし、その

ため診断用スクリーニングには適さない場合もある。

本発明は、増幅及び固定化された一本鎖形のDNAの4つのアリコート（分割試料）についてポリメラーゼ連鎖反応を行なうという発想に基づくものである。各々のアリコートについて、同一の特異的伸長プライマーと異なるジデオキシヌクレオチドを用いるが、デオキシヌクレオチドは使用せず、こうして、標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドだけが組込まれるようにする。このとき、上記標的位置は上記DNAにハイブリダイズする特異的伸長プライマーの3'末端の直ぐ隣である。言い換えると、固定化鎖上での標的位置は、当該DNAに特異的伸長プライマーがハイブリダイズする場所の直ぐ5'側である。次に、通常のデオキシヌクレオチドを用いた鎖伸長反応（いわゆる追跡反応）を上記特異的プライマーを用いて行なって、ジデオキシヌクレオチドでブロックされたDNAが未反応のまま残る一方で、ブロックされていないDNAは二本鎖DNAを形成するようにする。次に、各種の方法を用いて二本鎖DNAを非伸長鎖（即ち、実質的に一本鎖のDNA）と区別して、標的位置の塩基の同定ができるようにする。

このように、本発明は、DNA配列のある標的位置の塩基を同定する方法にして、試料DNAを増幅処理に付し、その増幅DNAを固定化した後で二本鎖解離処理に付して、標的位置の直ぐ隣にハイブリダイズするような伸長プライマーから非固定鎖を取り除いておき、固定化された一本鎖DNAの4つのアリコートの各々を1種類のジデオキシヌクレオチド存在下でのポリメラーゼ反応に付し、その際、各アリコートについて異なるジデオキシヌクレオチドを用いて標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドだけが組込まれるようにしておき、次に、4つのアリコートを4種類すべてのデオキシヌクレオチドの存在下での伸長反応に付して、各アリコート中においてジデオキシヌクレオチドと反応していないDNAが伸長して二本鎖DNAを形成する一方で、ジデオキシヌクレオチドでブロックされたDNAは非伸長鎖DNAとして残るようにしておき、しかる後に、二本鎖及び／又は非伸長鎖DNAの同定を行なって、どのジデオキシヌクレオチドが導入されていて、したがってどの塩基が標的位置に存在しているのかを明らかにすることを特徴とする方法を提供する。

本明細書中で用いるジデオキシヌクレオチドという用語は、3'-水酸基が存在しない又は3'-水酸基が修飾されている2'-デオキシヌクレオチドであって、ポリメラーゼ存在下でプライマーに付加させることはできるがそれ以降の重合反応に入ることのできない2'-デオキシヌクレオチドをすべて包含する。

試料DNAはPCR法によってインヴィトロ (in vitro) で増幅させるのが好ましいが、インヴィトロ自続式配列複製法 (Self Sustained Sequence Replication; 3SR法と略される) やベクター中でのインヴィボ (in vivo) 増幅法のようなその他の方法も用いることができ、所望によっては、インヴィトロ及びインヴィボ増幅を併用してもよい。どのような増幅法を用いようとも、増幅されたDNAが固体担体に固定化されるか或いは固体担体への結合手段を備えているのが望ましい。例えば、PCRプライマーを固体担体に固定化してもよいし、或いはPCRプライマーに固体担体への結合手段を与えてもよい。また、ベクター内の試料DNAの挿入部位の隣に固体担体結合手段を含ませて、増幅試料DNAと結合手段とが一緒に切り出されるようにしてもよい。

PCR法では、標的DNAの既知配列に特異的な一対の重合用プライマーを選択する。即ち、一方のプライマーはそのDNA二本鎖の片方の鎖の5'末端もしくはその近傍にハイブリダイズし、もう一方のプライマーが相補鎖の5'末端もしくはその近傍にハイブリダイズするようにして、ポリメラーゼ存在下でそれぞれのプライマーから標的DNA鋳型の末端に至るまで伸長したDNA配列が生ずるようにする。こうして合成されたDNAを次に二本鎖解離処理 (通常は約90℃の温度で融解して行なう) に付すと、新たに合成された一本鎖DNA配列が混合液中の過剰のプライマーとハイブリダイズ (通常は温度をアニーリングに適した範囲まで下げた後) するので、ポリメラーゼ存在下でさらにDNA鎖が合成されるが、このときは両プライマーの末端から末端までの部分しか伸長しない。ポリメラーゼは上記二本鎖解離段階で利用される高温に耐え得るものが好ましいが、最近、これに適した好熱性ポリメラーゼ、即ちTaq、が入手できるようになった。DNA合成に必要な上記2種類のプライマーと各種ヌクレオチドとを媒液中に過剰量維持しておく、各々の鎖を合成し、解離し、プライマーをアニーリングし、さらに新しい鎖を合成するという循環過程の繰返しを、単にこれら各

々の段階の至適温度に温度を上下させるだけで遂行することができる。このようにして、最初の標的DNAを指数関数的に増幅させることができ、比較的短時間のうちに濃度を百万倍も増大させることができる。

PCR法を用いる場合には、例えば比較的低いレベルのバックグラウンドで明確な結果を与えるような十分なDNAが合成されたか否かを決定するために、そのPCR法の効率を評価するのが望ましい。各種の試験法が知られているが、本出願人の考えでは、本出願人が以前に報告した固定化増幅核酸を検出するためのDIANAという固相法(PCT/E P 90/00454)を用いるのが好ましい。このDIANA法は、例えばその好ましい具体的態様では、インヴィトロで増幅されたDNAの比色検出に用いられる。このアッセイはビオチン化又はその他の手段で官能化されたPCRプライマーの使用に基づくものであり、このプライマーはインヴィトロ増幅物を例えばストレプトアビジン被覆磁性ビーズ上に捕捉するために用いられる。もう一方のPCRプライマーはlacオペレーター配列のような「ハンドル」部を有しており、LacIリプレッサー- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を用いて捕捉DNAの比色検定を行なうことができる。(Wahlberg, J., Lundeberg, J., Hultman, T. and Uhlen, M. (1990) "General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid-phase genomic sequencing of the positive samples" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 6569-6573 参照)。

この好ましい形の定性的DIANAアッセイは、PCR方法の諸々の利点と、ビオチン-ストレプトアビジン系の高い特異性及び安定性と、 β -ガラクトシダーゼに基づく比色検定の簡単さとを併せ持っている。ビオチンとストレプトアビジンの強い相互作用($K_d = 10^{-15} \text{ M}^{-1}$)は系の効率をより一層高める。固体担体としての磁性ビーズの使用により、遠心処理、濾過処理或いは沈殿処理は全く必要なくなる(T. Hultman, S. Stahi, E. Hornes and M. Uhlen, Nuc. Acids Res. 17, 4937 (1989))。ただし、本発明の方法では、同一のPCRプライマーを固定化手段として用いると同時にlacオペレーター配列組込み用にも用いるのが好ましい。

特定のDNA配列に結合するタンパク質は多数知られており、オペロンの作動や抑制などの様々な遺伝プロセスに関与していることも多い。このようなタンパ

ク質の一つがl a cリプレッサーのL a c Iであり、これはl a cオペレーター(l a c O P)と反応して転写を抑制する。したがって、仮に認識部位がl a c O PのDNA配列あれば、L a c Iタンパク質を介して標識を結合させることができる。L a c IのようなDNA結合タンパク質ともう一つのタンパク質との融合タンパク質を工夫して、後者のタンパク質が、例えば色や蛍光や化学発光に基づく方法を用いた後段での検出に利用できるようにすると特に好ましい。このようなタンパク質の具体例は β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなどである。

標識としては、増幅DNAの末端に導入された21塩基対のl a cオペレーター配列を認識するようなL a c Iリプレッサー- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を使用するのが好ましい。このl a cオペレーター配列は、PCRプライマー対を使用する場合にはそのプライマー対の一方(好ましくは固定化プライマー)によって導入することもできるし、或いは、増幅ベクター内の、増幅試料DNAと一緒に切り出すのに適した位置にこの配列が存在していてもよい。この融合タンパク質はDNAのl a c O P配列に結合し、ONPG(o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド)の添加によって発色するので、これを分光光度法で測定することができる。この融合タンパク質とONPG(o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド)を使用すると迅速で簡単な比色アッセイを行なうことができ、放射性標識の使用に伴う安全性の問題は生じない。例えばIPTG(n-イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド)を加えると、この融合タンパク質をDNAから解離させることができる。

シグナル対ノイズ(S/N)比を高めるために、本出願人の係属中の出願PCT/EP90/00454に記載されているような二段階PCR法(ネステド(nested)プライマーを使用)を用いてもよく、そうすることによって、本発明の方法の感度を向上させることができる。このような予備増幅によって、試料中に混在している可能性のある他のDNAに比して標的DNAの濃度が大幅に増加するし、また、標的DNAの別の配列に特異的な少なくとも1種類のプライマーを用いて第二段増幅を行なうと「バックグラウンドノイズ」に比して標的DNAのシグナルが顕著に増大する。

適当なポリメラーゼであればどんなものを用いてもよいが、Taqポリメラーゼのような好熱性酵素を用いるのが好ましく、そうすれば、PCRの各サイクルごとに例えばクレノウフラグメントのようなポリメラーゼをわざわざ追加しなくても上述の温度サイクルを繰返すことができる。

PCRを一段階法又は二段階法のいずれで行なうにしても、本発明はアリコート間のはっきりとした差異に基づくものであるのでPCRの効率はさほど重要ではない。ただし、上述の通り、増幅DNAの有無をチェックするために最初に定量的DIANAを行なうのが好ましい。

1又はそれ以上のプライマーが担体に結合している場合のように増幅DNAの固定化がPCR増幅の一部として起こるようにしてもよいし、或いは、PCRプライマーの1つ又はそれ以上が後段での固定化を可能にするような官能基（例えばビオチン又はチオール基）を有していてもよい。プライマーの5'末端を固定化すると、そのプライマーから伸長したDNA鎖を固体担体に結合させることができ、そのDNA鎖の3'末端が担体から遠く離れるようになるので、後段でのポリメラーゼによる鎖伸長反応に利用できるようになる。

本発明では特に有用なプライマーを用いるが、このプライマーは、5'から3'方向への読み取り配列、当該プライマーが固定化できるような手段、DNA結合タンパク質の結合する配列、並びに標的DNA鎖の5'末端もしくはその近傍にハイブリダイズし得る配列を含んでなる。このようなプライマーを使用すると、固定化が可能になるだけでなく、ポリペプチド段階において二本鎖DNAが実質的に固定化部位に至るまで形成されたか否かを判定することができる。固定化手段とDNA結合タンパク質の結合する配列との間、或いはDNA結合タンパク質の結合する配列と標的DNAにハイブリダイズし得る配列との間に、幾つかのヌクレオチドが介在してもよいことは明らかであろう。

固定化手段はビオチンであるのが好ましいが、その他の官能基（例えばチオール基など）を使用してもよい。しかし、ストレプトアビジンとのビオチンの強い相互作用並びにビオチンはプライマーに比較的簡単に導入できることから、ビオチンを用いるのが好ましい。DNA結合タンパク質の結合する配列は、好ましくはlacオペレーターであり、これにはlacリプレッサータンパク質が可逆

的に結合する。

固体担体は、好適には、マイクロタイターウェル（従来の8×12形式のものが都合がよい）の形でもディップスティック（dipstick）の形であってもよく、これらはプライマーDNAと結合するような活性化ポリスチレンで作製し得る（K.Almer,博士論文,王立工業大学（Royal Institute of Technology）,スウェーデン国ストックホルム,1988）。担体は、また、例えばアガロース、セルロース、アルギン酸塩、テフロン又はポリスチレンなどで作られた粒子や繊維やキャピラリーであってもよい。担体は、磁性粒子、例えばDynal AS社（ノルウェー国オスロ）製の超常磁性ビーズなどであってもよい。

固体担体は、プライマーを結合するための、水酸基やカルボキシル基やアルデヒド基やアミノ基のような官能基又はアビジンやストレプトアビジンのような部分を保有していてもよい。これらは一般に、かかる官能基のいずれかを有するポリマーの表面コーティングを与えるような処理を担体に施すことによって与えることができ、例えば、ポリウレタンとポリグリコールを併用して水酸基を与えたり、セルロース誘導体で水酸基を与えたり、アクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマーでカルボキシル基を与えたり、或いはアミノアルキル化ポリマーでアミノ基を与えたりすることができる。米国特許第4654267号には、このような表面コーティングの導入法が多数記載されている。

アッセイ技術は非常に簡単で迅速であり、したがって多数の試料が迅速に分析できるようなロボット装置を用いて自動化するのは簡単である。好ましい検出及び定量は比色反応に基づいているので、視覚的な検査だけで判定できる場合も多い。

標的DNAは試料中のmRNAから合成されたcDNAであってもよく、本発明の方法はこうして特徴的なmRNAに基づく診断にも応用できる。このような予備合成は逆転写酵素による予備処理によって行なうことができるが、好適には、後段でPCRを行なう場合にはそのPCR段階で用いる緩衝液及び塩基の系と同じ系の中で行なう。PCR操作は二本鎖を解離させるための加熱処理を要するので、逆転写酵素は最初のPCRサイクルにおいて失活するはずである。mRNAが試料核酸である場合には、最初の試料（例えば血清試料）を固定化ボ

りd Tオリゴヌクレオチドで処理して、その末端ポリA配列を介してすべてのmRNAが回収できるようにするのが有利である。別法として、特異的RNA配列を介してRNAを回収するために、特異的オリゴヌクレオチド配列を用いることもできる。かかるオリゴヌクレオチドは、国際特許出願PCT/EP89/00304に記載されているように、後でcDNAに対するプライマーとして役立てることができる。

標的DNAを最初に増幅する好ましい方法としてPCRについて述べてきたが、PCRと組合わせる代わりに別の方法を用いてもよいことは当業者には明らかであろう。温度サイクリングも耐熱性ポリメラーゼも必要としない近年開発された増幅技術として、自続式配列複製(3SR)法がある。3SR法はレトロウイルスの複製をモデルにしたもので、増幅に使用することができる(Gingeras, T.R. et al, PNAS(USA)87: 1874-1878; 並びにGingeras, T.R. et al, PCR Methods and Amplifications Vol.1, pp25-33などを参照)。

伸長プライマーは、標的位置の直ぐ隣で固定化鎖と適度なハイブリダイゼーションを起こす程度の十分な大きさを有している一方で、不要な化学合成を避けるためにある程度短いほうが都合がよい。C-G間の対合の方が結合に参与する水素結合の数が多いので、プライマーの大きさ並びにハイブリダイゼーションの安定性がA-T塩基対のC-G塩基対に対する比率にある程度依存していることは当業者には明らかであろう。また、当業者であれば、当然に、伸長プライマーと増幅配列のその他の部分との相同性並びにそれに応じた条件設定(ストリンジェンシー)を考慮するはずである。このようなルーチン実験についての指針は、例えばSambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 著のMolecular Cloning: a laboratory manual (1989)などの文献に見出すことができる。伸長プライマーは試料を4つのアリコートに分割する前に加えるのが好ましいが、各々のアリコートに個別に伸長プライマーを加えてもよい。伸長プライマーはPCRプライマーと同一であってもよいが、系に追加要素を導入するために異なっているほうが好ましい。

ジデオキシヌクレオチド存在下でのポリメラーゼ反応は、T7ポリメラーゼ、クレノウ又はSequenase Ver. 2.0(米国USB社製)などの

、ジ

デオキシヌクレオチドの取込みを行なうポリメラーゼを使用して行なわれる。ただし、公知の通り、多くのポリメラーゼがブルーフリーディング（校正）活性、即ち、エラーチェック活性を有していて、鎖伸長に利用される3'末端の1個もしくはそれ以上のヌクレオチドが時により消化されることがある。本発明の方法でこのような消化が起こると、バックグラウンドノイズが増加する。この問題が起こらないように、例えばT7ポリメラーゼやSequenaseのような非ブルーフリーディング型ポリメラーゼを使用するのが好ましい。さもないと、ポリメラーゼによる3'消化を抑制するフッ素イオン又はヌクレオチドリン酸を各アリコートに加えるのが望ましい。

二本鎖DNA及び／又は非伸長DNAの同定は様々な方法で行なうことができる。二本鎖DNAに関しては、鎖伸長反応の際の放射標識の導入などの慣用技術で可能であるが、lacオペレーター配列を用いるのが好ましく、このlacオペレーター配列は好ましくは上述の通り増幅時にDNAに組込む。鎖全体の伸長によって二本鎖DNA配列が生じ、これにlacIリプレッサー-β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質が結合する。結合した融合タンパク質は上述の通り比色法で同定することができ、これによって伸長反応の起こった3つのアリコートが同定され、残りのアリコートに加えられたジデオキシ塩基が判明する。

プライマーの伸長がジデオキシヌクレオチドでブロックされた非伸長DNAに関しても数多くの同定法が可能であり、当業者には容易に分かるであろう。好ましくは、伸長プライマーの3'末端の下流にハイブリダイズするプローブ、即ち、伸長プライマーのハイブリダイゼーション部位と固定化鎖の5'末端の間の固定化鎖にハイブリダイズするプローブを用いる。プローブは標識の付いているもの或いは標識を結合するための手段を有しているものが適している。このようなプローブは一本鎖DNAには結合するが、二本鎖DNAには結合しない。

所望により、二本鎖DNAと一本鎖DNAの両方を同定してもよく、そうすると結果の正確性をさらにチェックすることができる。通常は、ジデオキシヌクレオチドを全く含んでいない対照実験並びに4種類すべてのジデオキシヌクレオチ

ドの混合物を含んだ「ゼロ対照実験」を行なうのが好ましい。

もう一つの同定手段は、本出願人の同一の出願日に係る係属出願（代理人参照番号：75. 57799）に開示されている方法で、鎖伸長反応時に放出されるピロリン酸を検出するというものである。各ヌクレオチドが取込まれる際に、ヌクレオチド三リン酸からピロリン酸が解離して、残ったヌクレオチドーリン酸が生長核酸鎖の末端に取込まれる。終結ジデオキシヌクレオチドが鎖に取込まれていないアリコートでは、鎖伸長反応時にピロリン酸の放出が盛んに起こる。このようなピロリン酸の放出はルシフェリンとルシフェラーゼを用いて測定することができる。ルシフェリン／ルシフェラーゼ系はピロリン酸の存在量に実質的に正比例して光を発する。

例えば遺伝病のキャリアーの遺伝的検査などの診断用途においては、試料はヘテロ接合性の材料を含んでいる。即ち、DNAの半分は標的位置に一つのヌクレオチドを有しているが、もう半分は別のヌクレオチドを有している。したがって、本発明の方法に用いられる4つのアリコートのうち、2つは陽性シグナルを与え、2つは半陽性シグナルを与えるであろう。したがって、各試料中の検出標識量を定量的に決定するのが望ましい。ホモ接合性試料の場合には、4つのアリコートのうち、3つが陰性で1つが陽性シグナルを与えることは明らかであろう。

好ましくは、本発明は、出願人の同一の出願日に係る係属出願（代理人参照番号：75. 57466）に教示されている発明と組合わせる。この係属出願に教示された発明では、PCRを用いて、問題とするDNA鎖の3'末端側に永久に結合したプライマーを与えるようなループ構造を導入する。例えば、このような修正法では、二本鎖DNAのうちの標的位置を含んでいる鎖の標的配列上に伸長プライマーを3'ループ構造の一部として組込む。この標的配列はその3'末端側に領域Aを有していて場合によってはその領域Aからさらに3'側に伸びたDNA領域Bが存在しており、上記標的配列に相補的な配列の3'末端側にハイブリダイズする第一のプライマーであって固体担体上に固定化されているか或いは固体担体に結合させるための手段の与えられている第一のプライマー並びに上記標的配列のA及び／又はBの少なくとも一部分にハイブリダイズする3'末端配

列を有していてかつその5'末端にはAと実質的に同一の配列を有する第二のプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅処理に上記二本鎖DNAを付す。この増幅処理によって、標的配列の3'末端に、領域A・ループ

を形成し得る領域・配列Aに相補的な領域A'を以上の順序で有する二本鎖標的DNAを生じさせる。しかる後に、増幅二本鎖DNAを固定化形で二本鎖解離処理に付して、そうすることにより、固定化されていない標的鎖を遊離させ、領域A'を領域Aに自然に或いは人為的にハイブリダイズさせてループを形成させる。領域A'の3'末端は標的位置の直ぐ隣にハイブリダイズする。ジデオキシ反応及び伸長反応では上記のハイブリダイズした部分をプライマーとして用いる。標的位置に組込まれた塩基はどのような方法で同定してもよいが、好ましくは、上記の係属中の出願75,577,999に教示されているピロリン酸の放出による方法で同定する。

本発明は、また、通常は少なくとも以下の構成成分：

(a) その検査に特異的な伸長プライマーであって、標的位置がそのプライマーの3'末端の直ぐ隣になるように試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマー；

(b) ポリメラーゼ；

(c) ジデオキシヌクレオチドとデオキシヌクレオチド；及び

(d) 任意成分としての固体担体

を含んだキットを包含する。

このキットを一次PCR増幅法で使用する場合には、キットは通常は少なくとも以下の構成成分：

(i) 少なくとも一方のプライマーがそのプライマーを固定化するための手段を有している一対のPCR用プライマー；

(ii) ポリメラーゼ、好ましくはTaq1ポリメラーゼのような耐熱性のポリメラーゼ；

(iii) PCR反応用の緩衝液；及び

(iv) デオキシヌクレオチド

も含んでいる。

酵素標識を使用する場合には、キットはその酵素の基質と検出系のその他の成分を含んでいるのが都合がよい。

好ましくは、上記プライマー対の一方はそのプライマーを固定化するための手段とタンパク質の結合する配列を共に含んでいる。好ましい形のプライマーは、(例えばストレプトアビジン被覆磁性ビーズへの)固定化用の手段として機能するビオチンと、標識用の手段としての lac オペレーターを含んでなる。上記のタイプの好ましいプライマーを用いて本発明を実施するためのキットは、lac I リプレッサータンパク質と結合した酵素標識を含んでいるのが好ましく、好ましい酵素標識は β -ガラクトシダーゼである。

以下、図面を参照しながら非限定的な実施例により本発明を説明するが、図面について説明すると、

図1は、本発明の方法を用いて1か所の標的位置の塩基を同定するためのプロトコールを示したものであり、

図2は、実施例1で使用したオリゴヌクレオチドプライマーを増幅用の試料DNAと共に示したものであり、

図3は、実施例で使用した別のオリゴヌクレオチドプライマーを試料DNAと共に示したものであり、かつ

図4は本発明の方法の実施例で得られた結果を示すグラフである。

材料と方法

細菌株及び酵素。

大腸菌 (*Escherichia coli*) RRIΔM15 株 (Ruther,U.(1982) "pUR 250 which allows rapid chemical sequencing of both strands of its inserts" *Nucleic Acids Res.*,10,5765-5772) を細菌ホストとして使用した。使用したプラスミドベクターは pRIT28 (Hultman,T.,Stahl,S.,Moks,T.and Uhlen,M.(1988) "Approaches to solid phase DNA sequencing" *Nucleosides& Nucleotides* 7,629-638) であった。

オリゴヌクレオチドの合成。

HIV逆転写酵素遺伝子(RT)の活性部位の一部をコードする領域(塩基625~1165; Myers, G., Korber, B., Berkovsky, J.A., Smith, R.F. and Pavlakis, G.N., Human Retroviruses and AIDS 1991 (Los Alamos National Laboratory, New Mexico 1991))に相補的な7種類のオリゴヌクレオチドプライマー: RIT135、RIT321、RIT322、RIT331、

RIT332及びRIT333(図2, 図3参照)を、自動DNA合成装置(スウェーデンのKABI-Pharmacia社製のGene Assembler Plus)上で製造業者の説明書通りホスホルアミダイト化学により合成した。RIT322はビオチンホスホルアミダイト(米国カリフォルニア州のClontech社製)を用いてビオチン化した。精製はpепRPC 5/5逆相カラム(スウェーデン国のKABI-Pharmacia社製)を用いて行なった。

酵素及びヌクレオチド.

各種制限酵素、T4 DNAリガーゼ(KABI-Pharmacia社製, スウェーデン)、T7 DNAポリメラーゼ(KABI-Pharmacia社製, スウェーデン)、Taq DNAポリメラーゼ(米国カリフォルニア州のCetus社製)及びSequenase ver 2.0(米国のUSB社製)は業者の忠告にしたがって使用した。デオキシヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドはドイツのBoehringer Mannheim社から入手した。

PCRクローニング

HIV-1の患者から得られた臨床試料(スウェーデン国ストックホルムのスウェーデン細菌学研究所(Swedish Bacteriology Laboratory; SBL))から、各5 pmolのRIT331とRIT333(図3)を用いた増幅によってHIV RTフラグメントをクローニングした。RIT331とRIT333は共に、上流BamHI及び下流EcoRI認識部位を導入するための「ハンドル」部を含んでいた。PCR反応混液は、200 μ Mの各dNTP、20 mMのTris-HCl (pH 8.7)、2 mMのMgCl₂、0.1%のTween 20及び0.5ユニットのAmpliTaqを含んでいて、最終容積は50 μ lと

した。温度プロフィールは、95℃で0.5分間の変性段階、次いで55℃で0.5分間のプライマーアニーリング段階、及び72℃で2分間の伸長段階にセットした。これらの段階を、Gene Amp PCR System PE 9600 (Perkin-Elmer社製、米国カリフォルニア州)を用いて30回繰り返した。こうしてPCR増幅したHIV RTフラグメント及びベクターpRIT28を共にBamHIとEcoRIで制限し、アガロースから切り出し

て精製した後、室温で1時間連結反応を行なった。この構築物でコンピテントRRIM15細胞を形質転換し、青/白選択 (Langley, E.K., Villarejo, M.R., Fowler, A.V., Zamenhof, P.J. and Zabin, I. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1254-1257) ができるようにIPTG (n-イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド)、X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド) 及びアンピシリンを含んだTBAB (前出のSambrook, J. and Maniatis, T. (1989) の文献) 平板上に塗末接種した。固相配列決定法 (Hultman, T., Bergh, S., Moks, T. and Uhlen, M. (1991) "Bidirectional solid-phase sequencing of *in vitro*-amplified plasmid DNA" Bio Techniques 10, 84-93) により、5つの白色コロニーが正しいインサートをもつプラスミドであることを確認した。これらのコロニーのうちの1つをpRIT-RTと名付け、以降の研究用として選んだ。このクローンはスウェーデン国ストックホルムの王立工業大学生化学科に保存してある。

DIANA検出ミニシーケンシング用鋳型の調製

pRIT28-RTのコロニーをバイアルに移して、10 μ lの20 mM Tris-HCl (pH 8.7) 中で99℃で5分間溶菌した。次いで1 μ lの溶菌液を、5 pmolのRIT135及びRIT322 (ビオチン化)、0.25 pmolのRIT321、200 μ Mの各dNTP、20 mMのTris-HCl (pH 8.7)、2 mMのMgCl₂、0.1%のTween 20及び0.5ユニットのAmpliTaqのPCR混液に移して、最終容積を50 μ lとした。プライマーRIT322は、後段でストレプトアビジン被覆固体担体に結合させるための5' ビオチンとlacOP認識配列を規定する21塩基とからなる。増幅を上記の通り行ない、得られたPCR生成物を次に、予備洗浄ストレプトア

ビジン被覆常磁性ビーズ (Lea, T., Vartdal, F., Nustad, K., et al. (1988) "Monosized, magnetic polymer particles: and their use in separation of cells and subcellular components and in the study of lymphocyte function in vitro" Journal of Molecular Recognition 1, 9-18)、即ち、製造業者の推奨する結合溶液で予備洗浄しておいた Dynabeads M280 ストレプトアビジン (ノルウェーの Dynal AS 社製) 上に固定化

した (Hultman, T., Stfihl, S., Hornes, E. and Uhlen, M. (1989) "Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support" Nucl. Acids Res. 17, 4937-4946)。固定処理後、ビーズを 50 μ l の結合/洗浄溶液で洗って、結合 DNA をアッセイした。DNA の固定化されたビーズを 50 μ l の融合タンパク質 lacI- β -ガラクトシダーゼ (ノルウェーの Dynal AS 社製) と混合し、20 分間インキュベートした。ビーズを DINA 緩衝液 (ノルウェーの Dynal AS 社製) で 4 回洗浄して過剰の融合タンパク質を除去し、壁の被膜によるバックグラウンドを排除するために最終段階で新しいチューブに変えた。100 μ l の o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド (ONPG, 1.25 mg/ml) を発色性基質として加え、そして 6 分後に 100 μ l の 1M Na_2CO_3 を添加して反応を停止した。上清の 405 nm の吸光度を EAR340AT ELISA プレートリーダー (SLT-Lab instruments, オーストリア) で測定して分析した。20 μ l の 0.1M NaOH と 5 分間インキュベートして融解により二本鎖を解離させて、一本鎖固定化 DNA 鋳型を生じさせ、これを再度 50 μ l の結合溶液、50 μ l の 1 \times TE で洗浄した。1 pmol の RIT332 (図 2) を用い、8 mM MgCl₂ 及び 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で容積を 13 μ l として、65 $^{\circ}\text{C}$ に 5 分間加熱して次に室温に 10 分間静置することによって、プライマーのアニーリングを行なった。

ミニシーケンシング反応

適合ジデオキシヌクレオチドに関して、6 つの別個の伸長反応 (1 つは ddATP のみで、1 つは ddCTP のみで、1 つは ddGTP のみで、1 つは ddT

TPのみで、1つは4種類すべてのddNTPと共に、1つはddNTPを全く加えずに)は、2 μ lのアニーリング混液、17mM Tris-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl₂、1mM DTT、1 μ Mの適合ジデオキシヌクレオチド及び0.13ユニットのSequenase Ver. 2を含んだ全量10 μ lの中で行なった。この実験の概略図を図1に示す。ジデオキシ取込み反応は室温で5分間行ない、20 μ lの0.5M EDTAの添加により停止させた。しかる後に、ビーズを30 μ lの10mM Tris-HCl (pH 7.5)で2回

洗浄した。次の伸長段階では、200 μ MのdNTP濃度を使用し、25mMのTris-HCl (pH 7.5)、12.5mMのMgCl₂、1mMのDTT及び0.13ユニットのSequenaseと共に全量を10 μ lとした。ジデオキシヌクレオチドが組込まれていないアリコートでは、Sequenaseによる鎖の伸長が起こって、完全な鎖長の二本鎖DNAがビーズに結合するようになる。室温で5分間インキュベーションした後、20 μ lの0.5M EDTAを加え、ビーズを40 μ lのDIANA緩衝液(ノルウェーのDynal AS社製)(0.1M Tris-HCl (pH 7.5), 0.15M NaCl, 0.1% Tween 20, 1mM MgCl₂及び10mM β -メルカプトエタノール)で洗浄した。

DIANAによる検出

結果はDIANA法(Wahlberg, J., Lundeberg, J., Hultman, T. and Uhlen, M. (1990) "General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid-phase genomic sequencing of the positive samples" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 6569-6573)で検出した。DNAの固定化されたビーズを50 μ lの融合タンパク質lacI- β -ガラクトシダーゼ(ノルウェーのDynal AS社製)と混合し、20分間インキュベートした。ビーズをDIANA緩衝液(ノルウェーのDynal AS社製)で4回洗浄して過剰の融合タンパク質を除去し、壁の被膜によるバックグラウンドを排除するために最終段階で新しいチューブに変えた。100 μ lのo-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド(O

NPG, 1.25 mg/ml) を発色性基質として加え、そして6分後に100 μ lの1M Na_2CO_3 を添加して反応を停止した。上清の405 nmの吸光度をEAR340AT ELISAプレートリーダー (SLT-Lab instruments, オーストリア) で測定して分析した。その結果を図4に示す。このアッセイでは、4種類すべてのジデオキシヌクレオチド (ddNTP) を使用した場合とddATPのみを使用した場合に低いシグナルが得られた。配列決定用プライマーの3'末端の次の相補塩基はジデオキシチミジンであるので、上記の結果は、このアッセイ法を使用してある特定の場所の塩基配列を検出することができることを示している。

実施例2

鋳型の調製

A Z T耐性を示す患者から得たHIV逆転写酵素遺伝子フラグメント (Pettersen, B. et al 未発表データ) を、RIT331とRIT333のプライマー対を用いて、ベクターpRIT28にPCRクローニングした。大腸菌RRIDM15株を形質転換して、青/白選択法 (前出のLangley, E.K., et al (1975)) を用いて選択した。細菌コロニーを99℃の20mM Tris-Cl (pH 8.7) 10 μ l中で5分間溶菌して、PCR増幅を行なった。次に、1 μ lの溶菌液を、5 pmolのプライマーセットA、200 μ Mの各dNTP、20mMのTris-Cl (pH 8.7)、2mMの MgCl_2 、0.1%のTween 20及び0.5ユニットのAmpliTaq DNAポリメラーゼ (米国カリフォルニア州のCetus社製) に加えて、最終容積を50 μ lとした。温度プロフィールには、95℃での0.5分間の変性段階、70℃での1.5分間のアニーリング/伸長段階が含まれており、これらの段階を30回繰り返した。上述の細菌コロニーの溶菌並びに上記反応操作には、GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer社製、米国カリフォルニア州) を用いた。PCR生成物を、ストレプトアビジンの共有結合した常磁性ビーズ (前出のLea, T. (1988)) であるDynabeads M280上に固定化した。ビーズは製造業者 (ノルウェーのDynaLab AS社) の使用説明書通りに使用し

た。固定化PCR生成物を0.10M NaOH中で10分間インキュベートした後、上清を除去することにより、一本鎖DNAを得た。固定化一本鎖DNAを、50 μ lの10mM Tris-Cl (pH7.5), 1mMEDTA, 2M NaClで洗浄し、次いで50 μ lの10mM Tris-Cl (pH7.5)で洗浄した。洗浄後、20mMのTris-Cl (pH7.5)、8mMのMgCl₂及び1pmolの配列決定用プライマーを加えて全量を13 μ lとした。混合液を65℃で5分間インキュベートした後、室温に冷却した。

ミニシーケンシング

ジデオキシヌクレオチド組込み反応は、常磁性ビーズ上に固定化された鋳型／

プライマー-フラグメント1 μ l (50 μ l PCR増幅反応液の1/13)と、0.13ユニットのSequenase version 2.0 (米国のUnited States Biochemical社製)と、0.5 μ lの10 μ M ddNTP (1種類)と、さらに25mM Tris-Cl (pH7.5), 12.5mM MgCl₂, 2.5mM DTTを含んだ緩衝液とからなる全量で10 μ lの混合液中で行なった。室温で5分間インキュベートした後、50 μ lの10mM Tris-Cl (pH7.5), 1mM EDTA, 2M NaCl, 1% Tween 20で洗浄し、次いで50 μ lの10mM Tris-Cl (pH7.5), 1mM EDTA, 2M NaClで洗浄し、最後に50 μ lの10mM Tris-Cl (pH7.5)で洗浄した。10mM Tris-Cl (pH7.5)で容積を5 μ lに調整した。対照フラグメントはddNTP非存在下で、ゼロ対照フラグメントは全種類のddNTP存在下で、DNAポリメラーゼとインキュベートした。これら様々な試料を次にELIDAで分析した。

ELIDA

上記のミニシーケンシングの各プレインキュベーション試料が完全なプライマー伸長をするか否かについてELIDA法でアッセイした。このアッセイは、LKB 1250ルミノメーターと電位差記録計を用いて行なった。ルミノメーターは内部標準光に対するレスポンスが10mVとなるように較正した。発光出力

は既知量のATP又はpp_iを添加して較正した。反応は室温で行なった。標準アッセイ容積は0.2mlであり、以下の成分：0.1M Tris-酢酸(pH7.75), 2mM EDTA, 10mM酢酸マグネシウム, 0.1%BSA, 1mM DTT, 0.4mg/ml ポリビニルピロリドン360000, 2μM dNTP, 100mg/ml D-ルシフェリン(BioOrbit社製, フィンランド), 4μg/ml L-ルシフェリン(BioOrbit社製, フィンランド), 0.3ユニット/ml ATP依存性スルフリラーゼ(Sigma, 米国)及び精製ルシフェラーゼ標品(Enzymatix, 英国)を含んでいた。使用したルシフェラーゼの量は、容積1mlで100pmolのATPに対してIVのレスポンスを与えるものであった。5分間のブレインキュベーションの後、アデノシン5'-ホスホ硫酸とNaFとdNMPとをそれぞれ最終濃度が2μM,

5mM, 0.4mMとなるように加えた。ジデオキシ組込み試料から分取した5μlの鋳型/プライマー-フラグメントを添加した後、0.13ユニットのSequenaseを添加して反応を開始した。反応は5分以内に完了した。

結果

ミニシーケンシング法の原理

ミニシーケンシング法の原理を図1に概略図として示す。この図では、残基Tの存在の有無を検査している。問題とする特定DNAフラグメントを、プライマー対の一方が5'末端がビオチン化されているようなPCR法で増幅する。PCR増幅した問題のDNA断片をストレプトアビジンの共有結合した磁性ビーズ上に固定化し、次いでNaOHで洗浄して一本鎖形に変換し、この一本鎖DNAに1種類のプライマーをアニールする。鋳型/プライマー-フラグメントを次に4つの異なるアリコートに分割し、これらをポリメラーゼ存在下にて4種類のddNTPの各々で別々に処理する。反応後、得られたフラグメントを洗浄して、4種類すべてのddNTPの存在するプライマー伸長反応の基質として用いる(図1参照)。DNA特異的重合反応の進行をELIDA法でモニターする。最初の反応においてジデオキシヌクレオチドが組込まれていると、次の「追跡」反応の際

にピロリン酸の生成が阻害される。対照的に、ジデオキシヌクレオチドの組込みが起こっていなければ、「追跡」反応時にピロリン酸が盛んに放出されて、ELIDA反応により発光する。このELIDAの結果から、プライマーの後に位置する最初の塩基が容易に推定される。4種類すべてのddNTPと共にインキュベートする陰性対照並びにddNTPの非存在下でDNAポリメラーゼとインキュベートする陽性対照を含めてもよい。

特定DNAのミニシーケンシング

あるddNTPの組込みは、ポリメラーゼ反応時にそれと相補的なジデオキシヌクレオチド(ddNTP)が存在した場合にのみ観察された。用いた条件下では、非相補塩基の組込みは全く観察されなかった。「追跡」反応の際には、非相補塩基とインキュベートした場合にのみ、pp_iの生成がELIDA法で検出された。相補塩基が組込まれた場合には、フリーな3' OH基を欠いているのでDNAの伸長は不可能であった。ddNTP 3種類を含んだ混合液を4種類使っ

てDNAフラグメント(最初の段階において)をインキュベートした場合にも同じ結果が得られた(データは示さず)。明瞭な結果を得るためにはエキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼを使用しなければならない点を強調しておくが、ある種のポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性が例えばフッ素イオンなどによって抑制できることが知られている。非相補塩基の組込みを防止するために低濃度(0.05~5 μM)のヌクレオチドを使用することも重要である。

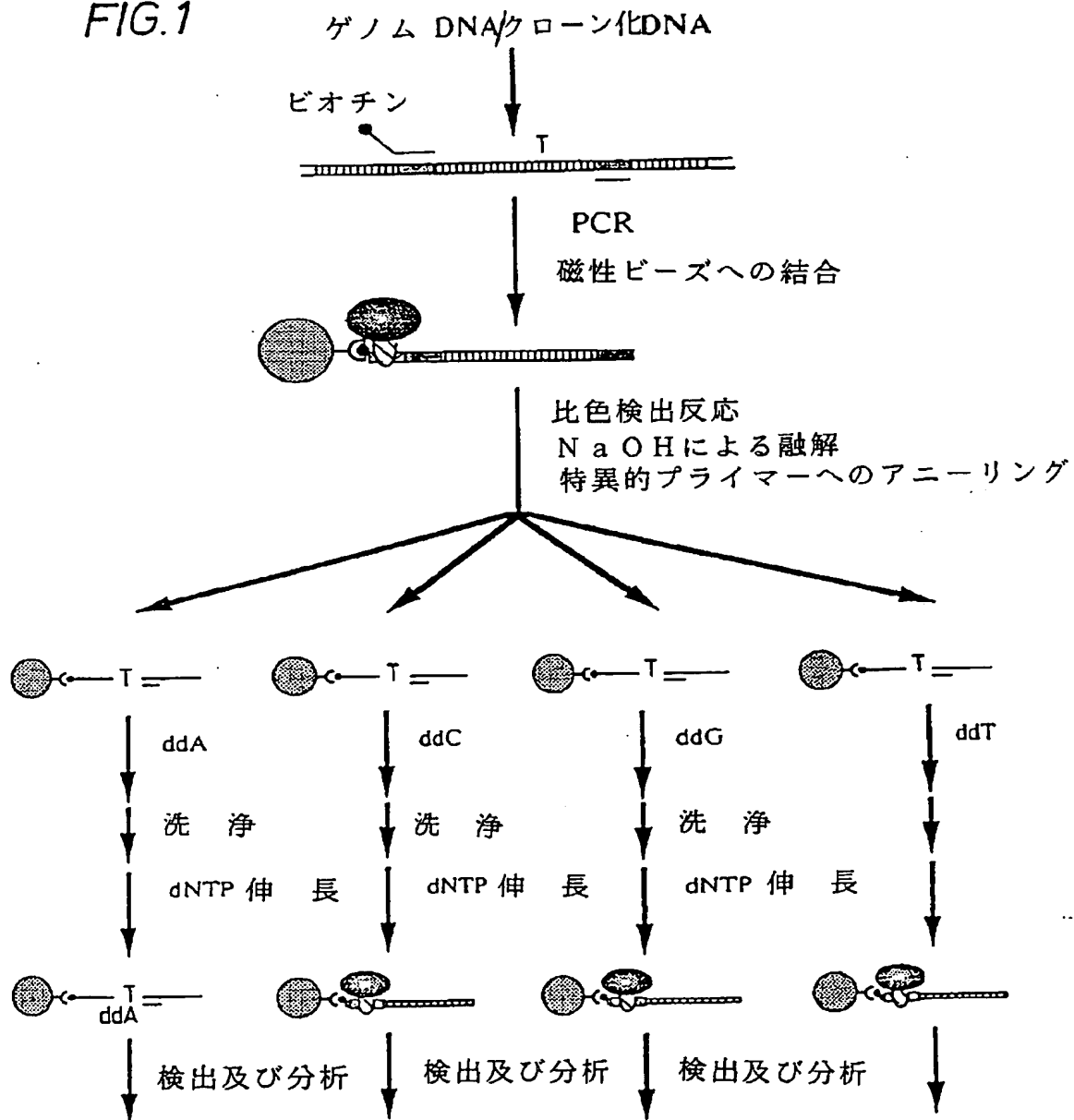
感度

上記で紹介した実験では50 μlのPCR増幅反応液の1/13をELIDA試験に使用した。しかし、使用量はこれより少なくても多くてもよい。161塩基長のDNAフラグメントのプライマー伸長反応の際のpp_i生成の初速度と生成量をDNA濃度の関数として求めた。ELIDAにおけるpp_i生成の初速度と生成量は共に、(50 μlのPCR増幅反応液の1/130から2/13まで)一定間隔で試験したDNA濃度に比例する。アッセイ時のシグナルを増大させるために、DNAの量をさらに増やしてもよいし、固体担体の結合容量を増やしてもよい。このアッセイ(全量200 μl)の上限はpp_i生成量200 pmol

である。下限は、主として、使用したDNAフラグメントの鎖長（シグナルはプライマー伸長反応時に組込まれるヌクレオチドの量に比例するため）、用いた容積、並びに異なる溶液中に混入した夾雑物により、によって決まる。後者の二つの因子は所望により修正することができる。

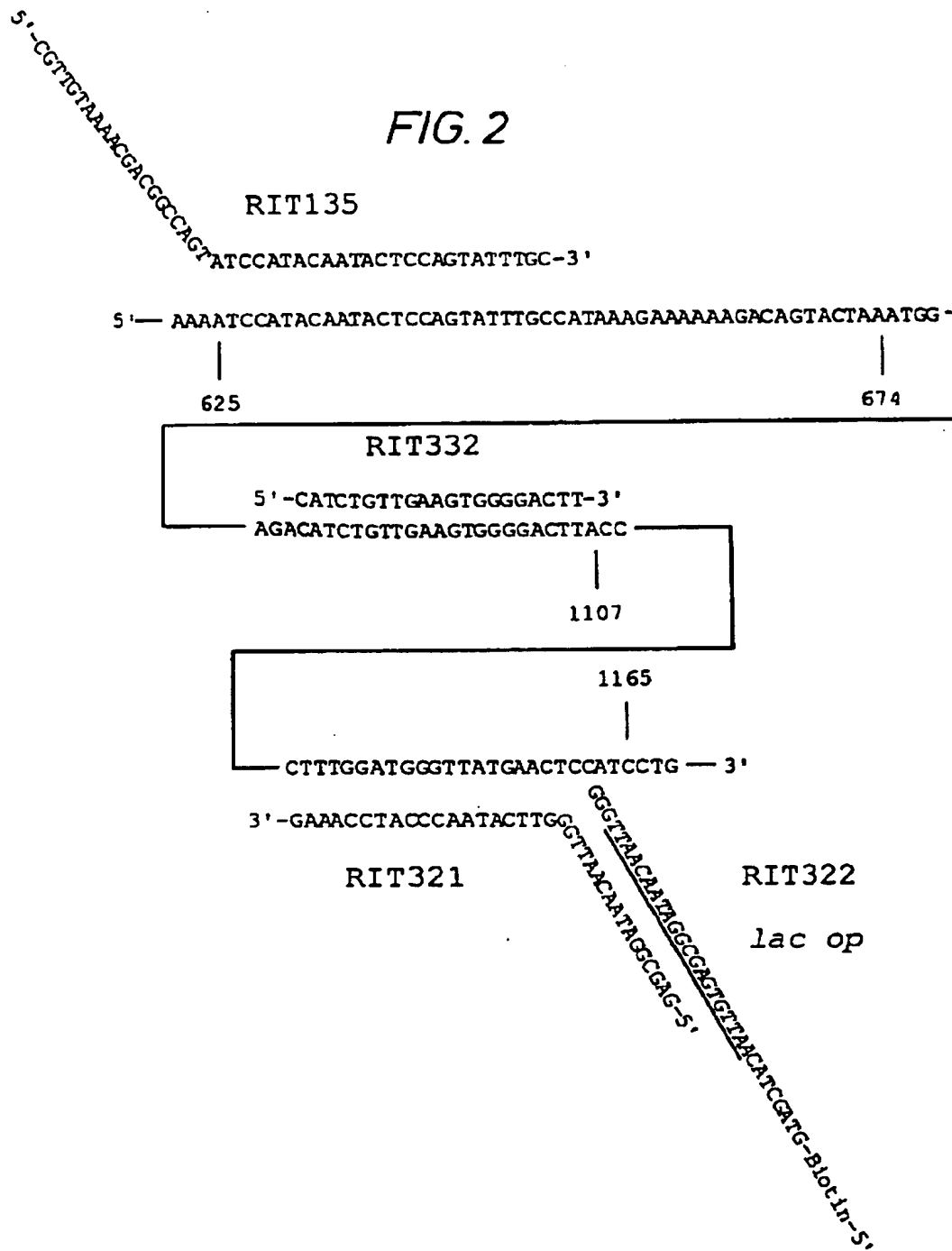
【図1】

FIG.1

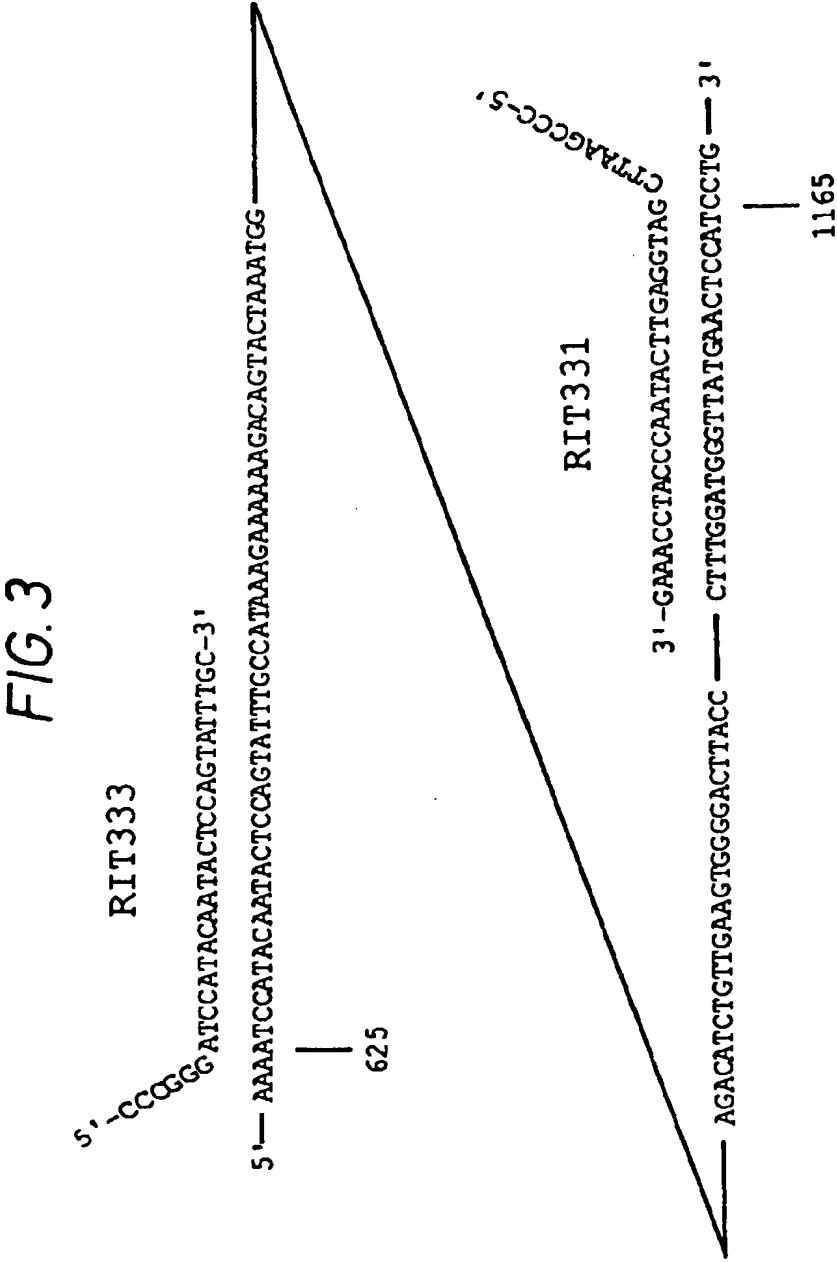


【図2】

FIG. 2



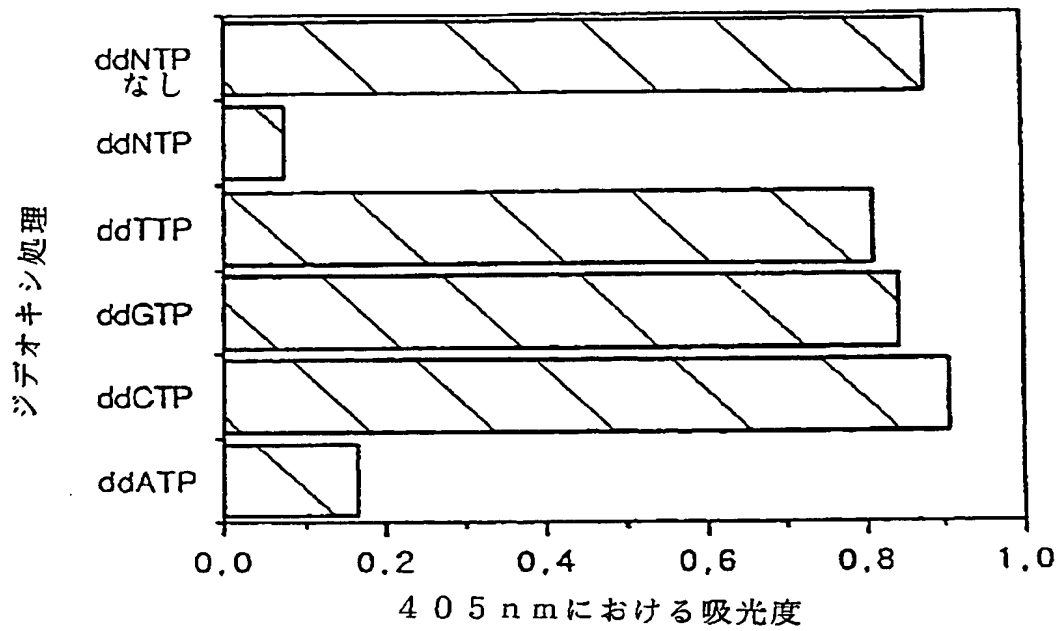
【図 3】



【図4】

FIG. 4

ミニシーケンシングの結果



【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年5月6日

【補正内容】

特許協力条約第34条(2)(b)に規定に基づく補正書における補正の対象及び補正の内容は以下の通りである。

1. 国際出願時における明細書第4頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻訳文第3頁18行「ポリメラーゼ・・・」から第4頁13行「・・・用いられる。」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第4頁8行「PCT/EP90/00454」の「PCT/EP90/00454 (WO90/11369)」への訂正に該当する）。

2. 国際出願時における明細書第6頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻訳文第5頁9行「増幅DNA・・・」から第6頁8行「・・・好ましい。」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第5頁23行「PCT/EP90/00454」の「PCT/EP90/00454 (WO90/11369)」への訂正に該当する）。

3. 国際出願時における明細書第8頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻訳文第7頁4行「これらは・・・」から同頁29行「・・・核酸である場合には、」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第7頁7行の「テフロン」の「テフロン（登録商標）」への訂正に該当する）。

4. 国際出願時における明細書第9頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻訳文第7頁29行「最初の試料・・・」から第8頁24行「・・・伸長プライマーは」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第8頁4～5行「PCT/EP89/00304」の「PCT/EP89/00304 (WO89/09282)」への訂正に該当する）。

5. 国際出願時における明細書第10頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻訳文第8頁24行「試料を4つ・・・」から第9頁19行「・・・数多くの」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第8頁29行「Sequense Ver. 2.0 (米国USB社製)」の「Sequense Ver. 2.0 (米国USB社製, Sequenseは登録商標である)」への訂正に該当

する)。

6. 国際出願時における明細書第11頁の差替え(特許法第184条の4に規定する翻訳文第9頁19行「同定法が・・・」から第10頁13行「・・・2つは」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第9頁29行～第10頁1行「代理人参照番号:75.57799」の「PCT/EP93/01205(WO93/23564)」への訂正に該当する)。

7. 国際出願時における明細書第12頁の差替え(特許法第184条の4に規定する翻訳文第10頁13行「半陽性・・・」から第11頁5行「・・・領域A'の3'末端は」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第10頁16～17行「代理人参照番号:75.57466」の「PCT/EP93/01204(WO93/23563)」への訂正に該当する)。

8. 国際出願時における明細書第13頁の差替え(特許法第184条の4に規定する翻訳文第11頁5行「標的位置の・・・」から同頁28行「・・・都合がよい。」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第11頁8行「75.57799」の「PCT/EP93/01205(WO93/23564)」への訂正に該当する)。

9. 国際出願時における明細書第15頁の差替え(特許法第184条の4に規定する翻訳文第12頁25行「HIV・・・」から第13頁28行「・・・HIVRT」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第13頁3行「Plus」の「Plus(登録商標)」への訂正、同頁12行「Sequenase ver 2.0(米国のUSB社製)」の「Sequenase ver 2.0(米国のUSB社製, Sequenaseは登録商標)」への訂正、及び同頁22行「Tween 20」の「Tween 20(Tweenは登録商標)」への訂正に該当する)。

10. 国際出願時における明細書第17頁の差替え(特許法第184条の4に規定する翻訳文第14頁23行「予備洗浄ストレプトアビジン・・・」から第15頁21行「・・・1つは」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第14頁28～29行「Dynabeads M280ストレプトアビジン(ノルウ

エーのDyna1 AS社製)」の「Dynabeads M280ストレプトアビジン（ノルウェーのDyna1 AS社製, Dynabeadsは登録商標）」への訂正に該当する）。

11. 国際出願時における明細書第18頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻訳文第15頁22行「ddATP・・・」から第16頁20行「・・・変えた。」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第15頁26行「Sequenase ver 2.0」の「Sequenase ver 2.0（Sequenaseは登録商標）」への訂正、同翻訳文第16頁3行「Sequenase」の「Sequenase（登録商標）」への訂正、及び同翻訳文第16頁4行「Sequenase」の「Sequenase（登録商標）」への訂正に該当する）。

12. 国際出願時における明細書第19頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻

訳文第16頁20行「100 μ 1のo-ニトロ・・・」から第17頁18行「・・・（前出のLea, T. (1988)）」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第17頁11行「Tween 20」の「Tween 20（Tweenは登録商標）」への訂正に該当する）。

13. 国際出願時における明細書第20頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻訳文第17頁18行「であるDynabeads・・・」から第18頁16行「・・・否かについて」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第17頁18行「Dynabeads M280」の「Dynabeads M280（Dynabeadsは登録商標）」への訂正、及び同翻訳文第18頁2～3行「Sequenase ver 2.0（米国のUnited States Biochemical社製）」の「Sequenase ver 2.0（米国のUnited States Biochemical社製, Sequenaseは登録商標）」への訂正に該当する）。

14. 国際出願時における明細書第21頁の差替え（特許法第184条の4に規定する翻訳文第18頁16行「ELIDA法で・・・」から第19頁12行「・

・・アリコートに分割し、」までの部分に該当し、具体的補正箇所は同翻訳文第19頁3行の「Sequenase」の「Sequenase（登録商標）」への訂正に該当する）。

ポリメラーゼ存在下でそれぞれのプライマーから標的DNA鋳型の末端に至るまで伸長したDNA配列が生ずるようにする。こうして合成されたDNAを次に二本鎖解離処理（通常は約90℃の温度で融解して行なう）に付すと、新たに合成された一本鎖DNA配列が混合液中の過剰のプライマーとハイブリダイズ（通常は温度をアニーリングに適した範囲まで下げた後）するので、ポリメラーゼ存在下でさらにDNA鎖が合成されるが、このときは両プライマーの末端から末端までの部分しか伸長しない。ポリメラーゼは上記二本鎖解離段階で利用される高温に耐え得るものが好ましいが、最近、これに適した好熱性ポリメラーゼ、即ちTaq、が入手できるようになった。DNA合成に必要な上記2種類のプライマーと各種ヌクレオチドとを媒液中に過剰量維持しておく、各々の鎖を合成し、解離し、プライマーをアニーリングし、さらに新しい鎖を合成するという循環過程の繰返しを、単にこれら各々の段階の至適温度に温度を上下させるだけで遂行することができる。このようにして、最初の標的DNAを指数関数的に増幅させることができ、比較的短時間のうちに濃度を百万倍も増大させることができる。

PCR法を用いる場合には、例えば比較的低いレベルのバックグラウンドで明確な結果を与えるような十分なDNAが合成されたか否かを決定するために、そのPCR法の効率を評価するのが望ましい。各種の試験法が知られているが、本出願人の考えでは、本出願人が以前に報告した固定化増幅核酸を検出するためのDIANAという固相法（PCT/EP90/00454（WO90/11369））を用いるのが好ましい。このDIANA法は、例えばその好ましい具体的態様では、インヴィトロで増幅されたDNAの比色検出に用いられる。このアッセイはビオチン化又はその他の手段で官能化されたPCRプライマーの使用に基づくものであり、このプライマーはインヴィトロ増幅物を例えばストレプトアビジン被覆磁性ビーズ上に捕捉するために用いられる。

増幅DNAの末端に導入された21塩基対のlacオペレーター配列を認識するようなLacIリプレッサー- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を使用するのが好ましい。このlacオペレーター配列は、PCRプライマー対を使用する場合にはそのプライマー対の一方（好ましくは固定化プライマー）によって導入することもできるし、或いは、増幅ベクター内の、増幅試料DNAと一緒に切り出すのに適した位置にこの配列が存在していてもよい。この融合タンパク質はDNAのlacOP配列に結合し、ONPG（ α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド）の添加によって発色するので、これを分光光度法で測定することができる。この融合タンパク質とONPG（ α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド）を使用すると迅速で簡単な比色アッセイを行なうことができ、放射性標識の使用に伴う安全性の問題は生じない。例えばIPTG（ n -イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド）を加えると、この融合タンパク質をDNAから解離させることができる。

シグナル対ノイズ（S/N）比を高めるために、本出願人の係属中の出願PCT/E P 90/00454（WO90/11369）に記載されているような二段階PCR法（ネステド（nested）プライマーを使用）を用いてもよく、そうすることによって、本発明の方法の感度を向上させることができる。このような予備増幅によって、試料中に混在している可能性のある他のDNAに比して標的DNAの濃度が大幅に増加するし、また、標的DNAの別の配列に特異的な少なくとも1種類のプライマーを用いて第二段増幅を行なうと「バックグラウンドノイズ」に比して標的DNAのシグナルが顕著に増大する。

適当なポリメラーゼであればどんなものを用いてもよいが、Taqポリメラーゼのような好熱性酵素を用いるのが好ましく、そうすれば、PCRの各サイクルごとに例えばクレノウフラグメントのようなポリメラーゼをわざわざ追加しなくても上述の温度サイクルを繰返すことができる。

PCRを一段階法又は二段階法のいずれで行なうにしても、本発明はアリコート間のはっきりとした差異に基づくものであるのでPCRの効率はさほど重要ではない。ただし、上述の通り、増幅DNAの有無をチェックするために最初に定量的DINAを行なうのが好ましい。

これらはプライマーDNAと結合するような活性化ポリスチレンで作製し得る (K.Almer, 博士論文, 王立工業大学 (Royal Institute of Technology), スウェーデン国ストックホルム, 1988)。担体は、また、例えばアガロース、セルロース、アルギン酸塩、テフロン (登録商標) 又はポリスチレンなどで作られた粒子や繊維やキャピラリーであってもよい。担体は、磁性粒子、例えばDynaI AS社 (ノルウェー国オスロ) 製の超常磁性ビーズなどであってもよい。

固体担体は、プライマーを結合するための、水酸基やカルボキシル基やアルデヒド基やアミノ基のような官能基又はアビジンやストレプトアビジンのような部分を保有していてもよい。これらは一般に、かかる官能基のいずれかを有するポリマーの表面コーティングを与えるような処理を担体に施すことによって与えることができ、例えば、ポリウレタンとポリグリコールを併用して水酸基を与えたり、セルロース誘導体で水酸基を与えたり、アクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマーでカルボキシル基を与えたり、或いはアミノアルキル化ポリマーでアミノ基を与えたりすることができる。米国特許第4654267号には、このような表面コーティングの導入法が多数記載されている。

アッセイ技術は非常に簡単で迅速であり、したがって多数の試料が迅速に分析できるようなロボット装置を用いて自動化するのは簡単である。好ましい検出及び定量は比色反応に基づいているので、視覚的な検査だけで判定できる場合も多い。

標的DNAは試料中のmRNAから合成されたcDNAであってもよく、本発明の方法はこうして特徴的なmRNAに基づく診断にも応用できる。このような予備合成は逆転写酵素による予備処理によって行なうことができるが、好適には、後段でPCRを行なう場合にはそのPCR段階で用いる緩衝液及び塩基の系と同じ系の中で行なう。PCR操作は二本鎖を解離させるための加熱処理を要するので、逆転写酵素は最初のPCRサイクルにおいて失活するはずである。mRNAが試料核酸である場合には、

最初の試料 (例えば血清試料) を固定化ポリdTオリゴヌクレオチドで処理して、その末端ポリA配列を介してすべてのmRNAが回収できるようにするのが有

利である。別法として、特異的RNA配列を介してRNAを回収するために、特異的オリゴヌクレオチド配列を用いることもできる。かかるオリゴヌクレオチドは、国際特許出願PCT/EP89/00304 (WO89/09282)に記載されているように、後でcDNAに対するプライマーとして役立てることができる。

標的DNAを最初に増幅する好ましい方法としてPCRについて述べてきたが、PCRと組合わせる代わりに別の方法を用いてもよいことは当業者には明らかであろう。温度サイクリングも耐熱性ポリメラーゼも必要としない近年開発された増幅技術として、自続式配列複製(3SR)法がある。3SR法はレトロウイルスの複製をモデルにしたもので、増幅に使用することができる(Gingeras, T. R. et al, PNAS (USA) 87: 1874-1878; 並びに Gingeras, T.R. et al, PCR Methods and Amplifications Vol.1, pp25-33 などを参照)。

伸長プライマーは、標的位置の直ぐ隣で固定化鎖と適度なハイブリダイゼーションを起こす程度の十分な大きさを有している一方で、不要な化学合成を避けるためにある程度短いほうが都合がよい。C-G間の対合の方が結合に参与する水素結合の数が多いので、プライマーの大きさ並びにハイブリダイゼーションの安定性がA-T塩基対のC-G塩基対に対する比率にある程度依存していることは当業者には明らかであろう。また、当業者であれば、当然に、伸長プライマーと増幅配列のその他の部分との相同性並びにそれに応じた条件設定(ストリンジェンシー)を考慮するはずである。このようなルーチン実験についての指針は、例えば Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.著のMolecular Cloning: a laboratory manual (1989)などの文献に見出すことができる。伸長プライマーは

試料を4つのアリコートに分割する前に加えるのが好ましいが、各々のアリコートに個別に伸長プライマーを加えてもよい。伸長プライマーはPCRプライマーと同一であってもよいが、系に追加要素を導入するために異なっているほうが好ましい。

ジデオキシヌクレオチド存在下でのポリメラーゼ反応は、T7ポリメラーゼ、

クレノウ又はSequenase Ver. 2.0 (米国USB社製, Sequenaseは登録商標である)などの、ジデオキシヌクレオチドの取込みを行なうポリメラーゼを使用して行なわれる。ただし、公知の通り、多くのポリメラーゼがプルーフリーディング (校正) 活性、即ち、エラーチェック活性を有していて、鎖伸長に利用される3'末端の1個もしくはそれ以上のヌクレオチドが時により消化されることがある。本発明の方法でこのような消化が起こると、バックグラウンドノイズが増加する。この問題が起こらないように、例えばT7ポリメラーゼやSequenaseのような非プルーフリーディング型ポリメラーゼを使用するのが好ましい。さもないと、ポリメラーゼによる3'消化を抑制するフッ素イオン又はヌクレオチドリン酸を各アリコートに加えるのが望ましい。

二本鎖DNA及び/又は非伸長DNAの同定は様々な方法で行なうことができる。二本鎖DNAに関しては、鎖伸長反応の際の放射標識の導入などの慣用技術で可能であるが、lacオペレーター配列を用いるのが好ましく、このlacオペレーター配列は好ましくは上述の通り増幅時にDNAに組込む。鎖全体の伸長によって二本鎖DNA配列が生じ、これにlacIリプレッサー- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質が結合する。結合した融合タンパク質は上述の通り比色法で同定することができ、これによって伸長反応の起こった3つのアリコートが同定され、残りのアリコートに加えられたジデオキシ塩基が判明する。

プライマーの伸長がジデオキシヌクレオチドでブロックされた非伸長DNAに関しても数多くの

同定法が可能であり、当業者には容易に分かるであろう。好ましくは、伸長プライマーの3'末端の下流にハイブリダイズするプローブ、即ち、伸長プライマーのハイブリダイゼーション部位と固定化鎖の5'末端の間の固定化鎖にハイブリダイズするプローブを用いる。プローブは標識の付いているもの或いは標識を結合するための手段を有しているものが適している。このようなプローブは一本鎖DNAには結合するが、二本鎖DNAには結合しない。

所望により、二本鎖DNAと一本鎖DNAの両方を同定してもよく、そうすると結果の正確性をさらにチェックすることができる。通常は、ジデオキシヌクレ

オチドを全く含んでいない対照実験並びに4種類すべてのジデオキシヌクレオチドの混合物を含んだ「ゼロ対照実験」を行なうのが好ましい。

もう一つの同定手段は、本出願人の同一の出願日に係る係属出願（PCT/E P 93/01205（WO 93/23564））に開示されている方法で、鎖伸長反応時に放出されるピロリン酸を検出するというものである。各ヌクレオチドが取込まれる際に、ヌクレオチド三リン酸からピロリン酸が解離して、残ったヌクレオチドーリン酸が生長核酸鎖の末端に取込まれる。終結ジデオキシヌクレオチドが鎖に取込まれていないアリコートでは、鎖伸長反応時にピロリン酸の放出が盛んに起こる。このようなピロリン酸の放出はルシフェリンとルシフェラーゼを用いて測定することができる。ルシフェリン／ルシフェラーゼ系はピロリン酸の存在量に実質的に正比例して光を発する。

例えば遺伝病のキャリアーの遺伝的検査などの診断用途においては、試料はヘテロ接合性の材料を含んでいる。即ち、DNAの半分は標的位置に一つのヌクレオチドを有しているが、もう半分は別のヌクレオチドを有している。したがって、本発明の方法に用いられる4つのアリコートのうち、2つは陽性シグナルを与え、2つは

半陽性シグナルを与えるであろう。したがって、各試料中の検出標識量を定量的に決定するのが望ましい。ホモ接合性試料の場合には、4つのアリコートのうち、3つが陰性で1つが陽性シグナルを与えることは明らかであろう。

好ましくは、本発明は、出願人の同一の出願日に係る係属出願（PCT/E P 93/01204（WO 93/23563））に教示されている発明と組合わせる。この係属出願に教示された発明では、PCRを用いて、問題とするDNA鎖の3'末端側に永久に結合したプライマーを与えるようなループ構造を導入する。例えば、このような修正法では、二本鎖DNAのうちの標的位置を含んでいる鎖の標的配列上に伸長プライマーを3'ループ構造の一部として組込む。この標的配列はその3'末端側に領域Aを有していて場合によってはその領域Aからさらに3'側に伸びたDNA領域Bが存在しており、上記標的配列に相補的な配列の3'末端側にハイブリダイズする第一のプライマーであって固体担体上に固定化さ

れているか或いは固体担体に結合させるための手段の与えられている第一のプライマー並びに上記標的配列のA及び／又はBの少なくとも一部分にハイブリダイズする3'末端配列を有していてかつその5'末端にはAと実質的に同一の配列を有する第二のプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅処理に上記二本鎖DNAを付す。この増幅処理によって、標的配列の3'末端に、領域A・ループを形成し得る領域・配列Aに相補的な領域A'を以上の順序で有する二本鎖標的DNAを生じさせる。しかる後に、増幅二本鎖DNAを固定化形で二本鎖解離処理に付して、そうすることにより、固定化されていない標的鎖を遊離させ、領域A'を領域Aに自然に或いは人為的にハイブリダイズさせてループを形成させる。領域A'の3'末端は

標的位置の直ぐ隣にハイブリダイズする。ジデオキシ反応及び伸長反応では上記のハイブリダイズした部分をプライマーとして用いる。標的位置に組込まれた塩基はどのような方法で同定してもよいが、好ましくは、上記の係属中の出願PCT/E P 9 3 / 0 1 2 0 4 (W O 9 3 / 2 3 5 6 3) に教示されているピロリン酸の放出による方法で同定する。

本発明は、また、通常は少なくとも以下の構成成分：

(a) その検査に特異的な伸長プライマーであって、標的位置がそのプライマーの3'末端の直ぐ隣になるように試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマー；

(b) ポリメラーゼ；

(c) ジデオキシヌクレオチドとデオキシヌクレオチド；及び

(d) 任意成分としての固体担体

を含んだキットを包含する。

このキットを一次PCR増幅法で使用する場合には、キットは通常は少なくとも以下の構成成分：

(i) 少なくとも一方のプライマーがそのプライマーを固定化するための手段を有している一対のPCR用プライマー；

(ii) ポリメラーゼ、好ましくはTaq1ポリメラーゼのような耐熱性のポ

リメラーゼ；

(iii) PCR反応用の緩衝液；及び

(iv) デオキシヌクレオチド

も含んでいる。

酵素標識を使用する場合には、キットはその酵素の基質と検出系のその他の成分を含んでいるのが都合がよい。

H I V 逆転写酵素遺伝子 (R T) の活性部位の一部をコードする領域 (塩基 625 ~ 1165 ; Myers, G., Korber, B., Berkovsky, J.A., Smith, R.F. and Pavlakis, G.N., Human Retroviruses and AIDS 1991 (Los Alamos National Laboratory, New Mexico 1991)) に相補的な7種類のオリゴヌクレオチドプライマー : R I T 1 3 5、R I T 3 2 1、R I T 3 2 2、R I T 3 3 1、R I T 3 3 2 及び R I T 3 3 3 (図2, 図3参照) を、自動DNA合成装置 (スウェーデンの K A B I - P h a r m a c i a 社製の G e n e A s s e m b l e r P l u s (登録商標)) 上で製造業者の説明書通りホスホルアミダイト化学により合成した。R I T 3 2 2 はビオチンホスホルアミダイト (米国カリフォルニア州の C l o n e t e c h 社製) を用いてビオチン化した。精製は p e p R P C 5 / 5 逆相カラム (スウェーデン国の K A B I - P h a r m a c i a 社製) を用いて行なった。

酵素及びヌクレオチド。

各種制限酵素、T4 DNAリガーゼ (K A B I - P h a r m a c i a 社製, スウェーデン)、T7 DNAポリメラーゼ (K A B I - P h a r m a c i a 社製, スウェーデン)、Taq DNAポリメラーゼ (米国カリフォルニア州の C e t u s 社製) 及び S e q u e n a s e v e r 2.0 (米国USB社製, S e q u e n a s e は業者の忠告にしたがって使用した。デオキシヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドはドイツの B o e h r i n g e r M a n h e i m 社から入手した。

PCRクローニング

H I V - 1 の患者から得られた臨床試料 (スウェーデン国ストックホルムのスウェーデン細菌学研究所 (Swedish Bacteriology Laboratory ; S B L)) から、

各5 pmolのRIT331とRIT333 (図3) を用いた増幅によってHIV RTフラグメントをクローニングした。RIT331とRIT333は共に、上流BamHI及び下流EcoRI認識部位を導入するための「ハンドル」部を含んでいた。PCR反応混液は、200 μ Mの各dNTP、20 mMのTris-HCl (pH 8.7)、2 mMのMgCl₂、0.1%のTween 20 (Tweenは登録商標) 及び0.5ユニットのAmpliTaqを含んでいて、最終容積は50 μ lとした。温度プロフィールは、95℃で0.5分間の変性段階、次いで55℃で0.5分間のプライマーアニーリング段階、及び72℃で2分間の伸長段階にセットした。これらの段階を、Gene Amp PCR System PE 9600 (Perkin-Elmer社製、米国カリフォルニア州) を用いて30回繰り返した。こうしてPCR増幅したHIV RT

予備洗浄ストレプトアビジン被覆常磁性ビーズ (Lea, T., Vartdal, F., Nustad, K., et al. (1988) "Monosized, magnetic polymer particles: and their use in separation of cells and subcellular components and in the study of lymphocyte function in vitro" Journal of Molecular Recognition 1, 9-18)、即ち、製造業者の推奨する結合溶液で予備洗浄しておいたDynabeads M280ストレプトアビジン (ノルウェーのDynal AS社製、Dynabeadsは登録商標) 上に固定化した (Hultman, T., Stahl, S., Hornes, E. and Uhlen, M. (1989) "Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support" Nucl. Acids Res. 17, 4937-4946)。固定処理後、ビーズを50 μ lの結合/洗浄溶液で洗って、結合DNAをアッセイした。DNAの固定化されたビーズを50 μ lの融合タンパク質lacI- β -ガラクトシダーゼ (ノルウェーのDynal AS社製) と混合し、20分間インキュベートした。ビーズをDIANA緩衝液 (ノルウェーのDynal AS社製) で4回洗浄して過剰の融合タンパク質を除去し、壁の被膜によるバックグラウンドを排除するために最終段階で新しいチューブに変えた。100 μ lのオニトロフェニル- β -D-ガラクトシド (ONPG, 1.25 mg/ml) を発色性基質として加え、そして6分後に100 μ lの1M Na₂CO₃を添加して反応を停

止した。上清の405 nmの吸光度をE A R 3 4 0 A T E L I S A プレートリーダー (S L T-L a b i n s t r u m e n t s, オーストリア) で測定して分析した。20 μ l の0.1 M N a O H と5分間インキュベートして融解により二本鎖を解離させて、一本鎖固定化DNA鋳型を生じさせ、これを再度50 μ l の結合溶液、50 μ l の1 \times T E で洗浄した。1 p m o l のR I T 3 3 2 (図2) を用い、8 m M M g C l₂ 及び20 m M T r i s - H C l (p H 7.5) 中で容積を13 μ l として、65 $^{\circ}$ Cに5分間加熱して次に室温に10分間静置することによって、プライマーのアニーリングを行なった。

ミニシーケンシング反応

適合ジデオキシヌクレオチドに関して、6つの別個の伸長反応(1つは

dd A T P のみで、1つはdd C T P のみで、1つはdd G T P のみで、1つはdd T T P のみで、1つは4種類すべてのdd N T P と共に、1つはdd N T P を全く加えずに)は、2 μ l のアニーリング混液、17 m M T r i s - H C l (p H 7.5)、6 m M M g C l₂、1 m M D T T、1 μ M の適合ジデオキシヌクレオチド及び0.13ユニットのS e q u e n a s e V e r. 2 (S e q u e n a s e は登録商標)を含んだ全量10 μ l の中で行なった。この実験の概略図を図1に示す。ジデオキシ取込み反応は室温で5分間行ない、20 μ l の0.5 M E D T A の添加により停止させた。しかる後に、ビーズを30 μ l の10 m M T r i s - H C l (p H 7.5) で2回洗浄した。次の伸長段階では、200 μ M のd N T P 濃度を使用し、25 m M のT r i s - H C l (p H 7.5)、12.5 m M のM g C l₂、1 m M のD T T 及び0.13ユニットのS e q u e n a s e (登録商標)と共に全量を10 μ l とした。ジデオキシヌクレオチドが組込まれていないアリコートでは、S e q u e n a s e (登録商標)による鎖の伸長が起こって、完全な鎖長の二本鎖DNAがビーズに結合するようになる。室温で5分間インキュベーションした後、20 μ l の0.5 M E D T A を加え、ビーズを40 μ l のD I A N A 緩衝液(ノルウェーのD y n a l A S 社製) (0.1 M T r i s - H C l (p H 7.5), 0.15 M N a C l, 0.1% T w e e n 20, 1 m M M g C l₂ 及び10 m M β -メルカプトエタノール

)で洗浄した。

DIANAによる検出

結果はDIANA法 (Wahlberg, J., Lundeberg, J., Hultman, T. and

Uhlen, M. (1990) "General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid-phase genomic sequencing of the positive samples" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 6569-6573) で検出した。DNAの固定化されたビーズを50 μ lの融合タンパク質 lac I- β -ガラクトシダーゼ (ノルウェーの Dynal AS社製) と混合し、20分間インキュベートした。ビーズをDIANA緩衝液 (ノルウェーの Dynal AS社製) で4回洗浄して過剰の融合タンパク質を除去し、壁の被膜によるバックグラウンドを排除するために最終段階で新しいチューブに変えた。

100 μ lのp-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド (ONPG, 1.25 mg/ml) を発色性基質として加え、そして6分後に100 μ lの1M Na₂CO₃を添加して反応を停止した。上清の405 nmの吸光度をEAR340AT ELISAプレートリーダー (SLT-Lab instruments, オーストリア) で測定して分析した。その結果を図4に示す。このアッセイでは、4種類すべてのジデオキシヌクレオチド (ddNTP) を使用した場合と ddATPのみを使用した場合に低いシグナルが得られた。配列決定用プライマーの3'末端の次の相補塩基はジデオキシチミジンであるので、上記の結果は、このアッセイ法を使用してある特定の場所の塩基配列を検出することができることを示している。

実施例 2

鋳型の調製

AZT耐性を示す患者から得たHIV逆転写酵素遺伝子フラグメント (Pettersson, B. et al 未発表データ) を、RIT331とRIT333のプライマー対を用いて、ベクター pRIT28にPCRクローニングした。大腸菌RRIDM15株を形質転換して、青/白選択法 (前出の Langley, E.K., etal(1975)) を

用いて選択した。細菌コロニーを99℃の20mM Tris-Cl (pH8.7) 10 μ l中で5分間溶菌して、PCR増幅を行なった。次に、1 μ lの溶菌液を、5pmolのプライマーセットA、200 μ Mの各dNTP、20mMのTris-Cl (pH8.7)、2mMのMgCl₂、0.1%のTween 20 (Tweenは登録商標) 及び0.5ユニットのAmpli Taq DNAポリメラーゼ (米国カリフォルニア州のCetus社製) に加えて、最終容積を50 μ lとした。温度プロフィールには、95℃での0.5分間の変性段階、70℃での1.5分間のアニーリング/伸長段階が含まれており、これらの段階を30回繰り返した。上述の細菌コロニーの溶菌並びに上記反応操作には、Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer社製, 米国カリフォルニア州) を用いた。PCR生成物を、ストレプトアビジンの共有結合した常磁性ビーズ (前出のLea, T. (1988))

であるDynabeads M280 (Dynabeadsは登録商標) 上に固定化した。ビーズは製造業者 (ノルウェーのDyna1 AS社) の使用説明書通りに使用した。固定化PCR生成物を0.10M NaOH中で10分間インキュベートした後、上清を除去することにより、一本鎖DNAを得た。固定化一本鎖DNAを、50 μ lの10mM Tris-Cl (pH7.5), 1mM EDTA, 2MNaClで洗浄し、次いで50 μ lの10mM Tris-Cl (pH7.5) で洗浄した。洗浄後、20mMのTris-Cl (pH7.5)、8mMのMgCl₂及び1pmolの配列決定用プライマーを加えて全量を13 μ lとした。混合液を65℃で5分間インキュベートした後、室温に冷却した。

ミニシーケンシング

ジデオキシヌクレオチド組込み反応は、常磁性ビーズ上に固定化された鋳型/プライマー-フラグメント1 μ l (50 μ l PCR増幅反応液の1/13) と、0.13ユニットのSequenase version 2.0 (米国のUnited States Biochemical社製, Sequenaseは登録商標) と、0.5 μ lの10 μ M ddNTP (1種類) と、さらに25mM Tris-Cl (pH7.5), 12.5mM MgCl₂, 2.5mM DTTを含

んだ緩衝液とからなる全量で $10\mu\text{l}$ の混合液中で行なった。室温で5分間インキュベートした後、 $50\mu\text{l}$ の 10mM Tris-Cl (pH 7.5), 1mM EDTA, 2M NaCl, 1% Tween 20で洗浄し、次いで $50\mu\text{l}$ の 10mM Tris-Cl (pH 7.5), 1mM EDTA, 2M NaClで洗浄し、最後に $50\mu\text{l}$ の 10mM Tris-Cl (pH 7.5)で洗浄した。 10mM Tris-Cl (pH 7.5)で容積を $5\mu\text{l}$ に調整した。対照フラグメントはddNTP非存在下で、ゼロ対照フラグメントは全種類のddNTP存在下で、DNAポリメラーゼとインキュベートした。これら様々な試料を次にELIDAで分析した。

ELIDA

上記のミニシーケンシングの各プレインキュベーション試料が完全なプライマー伸長をするか否かについて

ELIDA法でアッセイした。このアッセイは、LKB 1250ルミノメーターと電位差記録計を用いて行なった。ルミノメーターは内部標準光に対するレスポンスが 10mV となるように較正した。発光出力は既知量のATP又はpp_iを添加して較正した。反応は室温で行なった。標準アッセイ容積は 0.2ml であり、以下の成分： 0.1M Tris-酢酸 (pH 7.75), 2mM EDTA, 10mM 酢酸マグネシウム, 0.1% BSA, 1mM DTT, 0.4mg/ml ポリビニルピロリドン 360000, $2\mu\text{M}$ ddNTP, 100mg/ml D-ルシフェリン (BioOrbit社製, フィンランド), $4\mu\text{g/ml}$ L-ルシフェリン (BioOrbit社製, フィンランド), 0.3 ユニット/ ml ATP依存性スルフィラーゼ (Sigma, 米国) 及び精製ルシフェラーゼ標品 (Enzymatix, 英国) を含んでいた。使用したルシフェラーゼの量は、容積 1ml で 100pmol のATPに対して 1V のレスポンスを与えるものであった。5分間のプレインキュベーションの後、アデノシン5'-ホスホ硫酸とNaFとdNMPとをそれぞれ最終濃度が $2\mu\text{M}$, 5mM , 0.4mM となるように加えた。ジデオキシ組込み試料から分取した $5\mu\text{l}$ の鋳型/プライマー-フラグメントを添加した後、 0.13 ユニットのSequen

a s e（登録商標）を添加して反応を開始した。反応は5分以内に完了した。

結果

ミニシーケンシング法の原理

ミニシーケンシング法の原理を図1に概略図として示す。この図では、残基Tの存在の有無を検査している。問題とする特定DNAフラグメントを、プライマー対の一方が5'末端がビオチン化されているようなPCR法で増幅する。PCR増幅した問題のDNA断片をストレプトアビジンの共有結合した磁性ビーズ上に固定化し、次いでNaOHで洗浄して一本鎖形に変換し、この一本鎖DNAに1種類のプライマーをアニールする。鋳型／プライマー-フラグメントを次に4つの異なるアリコートに分割し、

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 93/01203

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. 5 C12Q1/68		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. 5	C12Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁹		
Category ¹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP,A,0 412 883 (BERTIN & CIE) 13 February 1991	8
A	see abstract; claims	1,6
A	WO,A,8 909 283 (HYMAN E. D.) 5 October 1989 see page 1, line 29 - page 3, line 33 see page 8, line 9 - line 29; claims	1,6
A	WO,A,8 912 063 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 14 December 1989 see the whole document	1,2
P,X	WO,A,9 308 305 (DYNAL AS) 29 April 1993 see claim 11	8,9
--- -/-		
<p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understate the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
27 AUGUST 1993		06.09.93
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		LUZZATTO E.R.

International Application No.

PCT/EP 93/01203

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claims No.
P,X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY vol. 208, no. 1, January 1993, NEW YORK US pages 171 - 175 P. NYREN ET AL. -----	1,2,6

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9301203
SA 74813

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 27/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0412883	13-02-91	FR-A- 2650840	15-02-91
		AU-A- 6180190	11-03-91
		CA-A- 2038932	12-02-91
		WO-A- 9102087	21-02-91
		JP-T- 4502862	28-05-92
WO-A-8909283	05-10-89	US-A- 4971903	20-11-90
		AU-A- 3354889	16-10-89
WO-A-8912063	14-12-89	AU-A- 3835089	05-01-90
		EP-A- 0418320	27-03-91
		JP-T- 3503001	11-07-91
WO-A-9308305	29-04-93	None	

IPO FORM 8079

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成12年10月10日(2000.10.10)

【公表番号】特表平8-500724
 【公表日】平成8年1月30日(1996.1.30)
 【年通号数】
 【出願番号】特願平5-519892
 【国際特許分類第7版】

C12Q 1/68
 C12N 15/09

【F I】

C12Q 1/68 A
 C12N 15/00 A

訂正明細書

平成12年5月1日

特許庁長官 殿

- 1 事件の表示
 平成5年特許第519892号
- 2 補正する事
 事件との関係 特許引当人
 名 称 セミュー・バイオテクノロジー・アソシエーツ
- 3 代理人
 住 所 東京都千代田区永田町1丁目11番28号
 相五永田町ビルディング 8階
 電話 3581-9371
 氏 名 (7101) 弁護士 山崎 行 道
 所 員
 氏 名 (7603) 弁護士 木村 博
- 4 補正の理由の所在
 平成 年 月 日(発注日)
- 5 補正対象書類名
 明細書及び請求の範囲
- 6 補正対象項目名
 明細書及び請求の範囲
- 7 補正の内容
 記載のとおり。

訂正明細書

DNA配列の解析のための化学的方法

本発明は、DNA配列の標的位点にある塩基を同定するための新規方法に関する。

診断又は法廷用のDNA解析では、1個の塩基の置換やミスマッチを検出すれば必要な情報が得られるような場合に標的DNAを完全に配列決定する必要はない。このような1塩基置換やミスマッチは例えば点変異によって生ずることもあるし、遺伝情報の欠失や挿入によっても生ずるが、このような場合には配列中の最初の塩基塩基を抽出すれば診断に必要な情報が得られるであろう。こうした点から、対立塩基子特異的PCR法が開発された。この方法では、標的DNAに対して一対のプライマー対を用いて試料のPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を行なうが、上記プライマー対の片方は比較短くして標的DNAの一方の対立塩基子塩基とはハイブリダイズするがもう一方の対立塩基子配列とはハイブリダイズしない。したがって、塩基が合致しなければ、ハイブリッドを形成しない対立型のDNAが存在していることの指標となるが、残念ながら、正常なDNAに稀発にハイブリダイズさせるために必要とされる過剰な条件を現実に行なうことは困難である。

標的塩基又は対立塩基塩基から離れた位置にハイブリダイズするようなプローブを使用した後、突然変異領域又は対立塩基領域とはハイブリダイズしないような保護プローブを用いて、PCRを行なうことが提案されている。しかし、この方法も一般に信頼性を欠ける。

対立塩基子特異的DNAを検出するためのリガーゼ連鎖反応(LCR)と呼ばれる方法が最近開発されており、パニングによって駆逐されている(H. Barzag, PCR Methods and Applications Vol.1, 5-16)。この方法では、増幅DNA上で互いに隣接してハイブリダイズするような2つの異なるオリゴヌクレオチドが基であり、結果を判定する前にLCR生成物をポリアクリルアミドゲル上で分離する必要がある。

完全に配列を決定する方法、特にWO89/09282に記載されているよう

な固相配列決定法は正確な結果を与えるが、もっと多量な労力が必要とし、そのため漸増スクリーニングには適さない場合もある。

本発明は、増幅及び固定化された一本鎖形のDNAの4つのアリコート（分割試料）についてポリメラーゼ連鎖反応を行なうという発想に基づくものである。各々のアリコートについて、4つの特異的伸長プライマーと異なるジデオキシヌクレオチドを用いるが、デオキシヌクレオチドは使用せず、こうして、標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドだけが組み込まれるようにする。このとき、上記標的的位置は上記DNAにハイブリダイズする特異的伸長プライマーの3'末端の塩基と隣である。言い換えると、固定化膜上での標的的位置は、当該DNAに特異的伸長プライマーがハイブリダイズする場所の直ぐ5'側である。次に、通常のデオキシヌクレオチドを用いた伸長反応（いわゆる逆増幅法）を、上記特異的プライマーを用いて行なって、ジデオキシヌクレオチドでブロックされたDNAが未反応のまま残る一方で、ブロックされていないDNAは二本鎖DNAを形成するようにする。次に、各種の方法を用いて二本鎖DNAを非特異的（即ち、質的に一本鎖のDNA）と区別して、標的塩基の塩基の同定ができるようにする。

このように、本発明は、DNA配列のある標的塩基の塩基を同定する方法にして、原料DNAを増幅系列に付し、その増幅DNAを増幅化した後で（本発明の発明に付して、非特異的を取り除き、標的塩基の直ぐ隣で固定化）DNAにハイブリダイズするような伸長プライマーを与え、固定化された一本鎖DNAの4つのアリコートの各々を1種類のデオキシヌクレオチド存在下でのポリメラーゼ反応に付し、その際、各アリコートにおいて異なるジデオキシヌクレオチドを用いて標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドだけが組み込まれるようにしておき、次に、4つのアリコートを4種類のすべてのデオキシヌクレオチド存在下での伸長反応に付して、各アリコート小においてジデオキシヌクレオチドと反応していないDNAが伸長して二本鎖DNAを形成する一方で、ジデオキシヌクレオチドでブロックされたDNAは非特異的鎖DNAとして残るようになっておき、しかる後に、二本鎖及び/又は非特異的鎖DNAの同定を行なって、どのジデオキ

シヌクレオチドが導入されている、したがってどの塩基が標的塩基に存在しているのかを明らかにすることを容易とする方法を提供する。

本明細書中で用いるジデオキシヌクレオチドという用語は、3'-水酸基が存在しない又は3'-水酸基が修飾されている2'-デオキシヌクレオチドであって、ポリメラーゼ存在下でプライマーに付加させることはできるがそれ以外の反応反応に入ることはできない2'-デオキシヌクレオチドをすべて含む。

試料DNAはPCR法によってインヴィトロ（*in vitro*）で増幅させるのが好ましいが、インヴィトロ自給式配列複製法（Self-Sustained Sequence Replication；SSR法と略される）やベクター中でのインヴィトロ（*in situ*）増幅法のようなその他の方法を用いることができ、所望によっては、インヴィトロ及びインヴィトロ増幅を併用してもよい。どのような増幅法を用いようとも、増幅されたDNAが固体担体に固定化されるか或いは固体担体への結合手段を備えているのが望ましい。例えば、PCRプライマーを固体担体に固定化してもよいし、或いはPCRプライマーに固体担体への結合手段を与えてもよい。また、ベクター内の試料DNAの挿入部位の隣に固体担体結合手段を含ませて、増幅試料DNAと結合手段とが一緒に切り取られるようにしてもよい。

PCR法では、標的DNAの両端配列に特異的な一方の固定用プライマーを選択する。即ち、一方のプライマーはそのDNA一本鎖の一方の端の5'末端もしくはその近傍にハイブリダイズし、もう一方のプライマーが対称性の5'末端もしくはその近傍にハイブリダイズするようにして、ポリメラーゼ存在下でそれぞれのプライマーから標的DNA断片の末端に至るまで伸長したDNA配列が生ずるようにする。こうして合成されたDNAを次に（本発明の発明（通常は約90℃での温度で加熱して行なう）に付して、新たに合成された一本鎖DNA配列が融合液中の過剰のプライマーとハイブリダイズ（通常は温度をアンニリングに適した範囲まで下げた後）するので、ポリメラーゼ存在下でさらにDNA鎖が合成されるが、このときは両プライマーの末端から本端までの部分しか伸長しない。ポリメラーゼは通常二鎖複製段階で利用されるために耐えられるのが好ましいが、望み、これに適した好適なポリメラーゼ、即ちTaq、が入手できるように

なった。DNA合成に必要な上記2種類のプライマーと各塩基ヌクレオチドとを溶液中に過剰量維持しておく、各々の鎖を合成し、解離し、プライマーをアンニリングし、さらに新しい鎖を合成するという循環過程の繰返しを、単にこれら各々の段階の平均速度に依存を調節するだけで進行させることができる。このようにして、最初の標的DNAを増幅回数に増幅させることができ、比較的短時間のうちに感度を百万倍も増大させることができる。

PCR法を用いる場合には、例えば比較的低いレベルのバックグラウンドで明確な結果を与えるような十分なDNAが合成されたか否かを決定するために、そのPCR法の効率を評価するのが望ましい。各種の試験法が知られているが、本発明人の考えでは、本発明人が以前に報告した固定化増幅増強法を用いるためのDINAという同相法（PCT/EP90/00454（WO90/11369））を用いるのが好ましい。このDINA法は、例えばその好ましい具体的増強では、インヴィトロで増幅されたDNAの比色検出に用いられる。このアッセイはピオチン又はその他の下段で固定化されたPCRプライマーの使用に基づくものであり、このプライマーはインヴィトロ増幅物を例えばストレプトアビジン結合剤性ビーズに吸着するために用いられる。もう一方のPCRプライマーは1.9.6オペレーター配列のような「ハンドル」部を有しており、1.9.6オペレーター-β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質を用いて増幅DNAの比色検出を行なうことができる。（Wahberg, J., Lundberg, J., Hulman, T. and Uhlen, M. (1991) "General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid-phase genomic sequencing of the positive samples." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 6569-6573 参照）。この好ましい形の定性的DINAアッセイは、PCR方法の諸々の利点と、ピオチン-ストレプトアビジン結合の強い特異性及び安定性と、β-ガラクトシダーゼに基づく比色検出の簡単さとを併せ持っている。ピオチン-ストレプトアビジンの強い相互作用（ $K_d = 10^{-13} M^{-1}$ ）は系の感度をより一層高める。固体担体としての磁性ビーズの使用により、過剰塩、洗脱処理或いは洗脱液は全く必要なくなる（T. Hulman, S. Sahl, E. Hovma and M. Uhlen, Nucl. Acids Res. 12, 4937 (1984)）。ただし、本発明の方法では、同一のPCRプライ

マーを固定化手段として用いると同時に1.9.6オペレーター配列検出にも用いるのが好ましい。

特定のDNA配列に結合するタンパク質は多数知られており、オペレーターの発動や抑制などの様々な遺伝子プロセスに関与していることも多い。このようなタンパク質の一つが1.9.6オペレーター-β-ガラクトシダーゼであり、これは1.9.6オペレーター（1.9.6OP）と反応して転写を抑制する。したがって、仮に促進部位が1.9.6OPのDNA配列であれば、1.9.6OPタンパク質を介して標的を結合させることができる。1.9.6OPのようなDNA結合タンパク質ともう一つのタンパク質との融合タンパク質を生成して、後者のタンパク質が、例えば色や蛍光や化学発光に基づく方法を用いた後段での検出に利用できるようにすると特に好ましい。このようなタンパク質の具体例はβ-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなどである。

標的としては、増幅DNAの末端に導入された21塩基の1.9.6オペレーター配列を認識するような1.9.6OPタンパク質-β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質を使用するのが好ましい。この1.9.6オペレーター配列は、PCRプライマー対を使用する場合にはそのプライマー対の一方（好ましくは固定化プライマー）によって導入することもできるし、或いは、増幅ベクター内の、増幅試料DNAと一緒に切り出すのに適した位置にこの配列が存在していてもよい。この融合タンパク質はDNAの1.9.6OP配列に結合し、ONPG（o-ニトロフエニル-β-D-ガラクトシド）の添加によって発色するので、これを分光光度計で測定することができる。この融合タンパク質とONPG（o-ニトロフエニル-β-D-ガラクトシド）を使用すると迅速で簡単な比色アッセイを行なうことができ、放射線標識の使用に伴う安全上の問題は少ない。例えばTPG（o-ニトロプロピル-β-D-ガラクトシド）を加えると、この融合タンパク質をDNAから解離させることができる。

シグナル対ノイズ（S/N）比を高めるために、本発明人の供試中の菌株PCT/EP90/00454（WO90/11369）に記載されているような（発明PCR法（ヌクレオ酸）プライマーを使用）を用いてもよく、そうすること

によって、本発明の方法の感度を向上させることができる。このような予備増幅によって、試料中に存在している可能性のある他のDNAに比して目的DNAの濃度が大幅に増加する。また、目的DNAの別の配列に特異的な少なくとも1種類のプライマーを用いて第二段増幅を行なうと「バックグラウンドノイズ」に比して目的DNAのシグナルが顕著に増大する。

適当なポリメラーゼであればどんなものを用いてもよいが、Taqポリメラーゼのような好熱性酵素を用いるのが好ましく、そうすれば、PCRの各サイクルごとに例えばクレノウアップメントのようなポリメラーゼをわざわざ追加しなくても上述の温度サイクルを駆進することができる。

PCR第一段階法又は第二段階法のいずれで行なうにしても、本発明はアリコート間のはっきりとした差異に基づくものであるのでPCRの効率はさほど重要ではない。ただし、上述の通り、増幅DNAの有無をチェックするために最初に定量的DNAを行なうのが好ましい。

1又はそれ以上のプライマーが塩基に結合している場合のように増幅DNAの固定化がPCR増幅の一部として起こるようにしてもよいし、或いは、PCRプライマーの1つ又はそれ以上が後段での固定化を可能にするような質的基（例えばデオキシ又はチオール基）を有しているもよい。プライマーの3'末端を固定化すると、そのプライマーから伸出したDNA鎖を塩基対に結合させることができ、そのDNA鎖の3'末端が塩基対から離れるようになるので、後段でのポリメラーゼによる鎖伸張反応に利用できるようになる。

本発明では特に有用なプライマーを用いるが、このプライマーは、5'から3'方向へ向かって、当該プライマーが固定化できるような手段、DNA結合タンパク質の結合する配列、並びに目的DNA鎖の5'末端もしくはその近傍にハイブリダイズし得る配列を含んでなる。このようなプライマーを使用すると、固定化が可能になるだけでなく、重合反応において「本鎖DNAが質的に固定化部位に由来するまで形成されたか否かを判定することができる。固定化手段とDNA結合タンパク質の結合する配列との間、或いはDNA結合タンパク質の結合する配列と目的DNAにハイブリダイズし得る配列との間に、幾つかのメクレオチド

が介在してもよいことは明らかであろう。

固定化手段はデオチンであるのが好ましいが、その他の有機基（例えばチオール基など）を用いてもよい。しかし、ストレプトアビジンのデオチンの強い相互作用並びにデオチンはプライマーに比較的簡単に導入できることから、デオチンを用いるのが好ましい。DNA結合タンパク質の結合する配列は、好ましくは1a.cオペレーターであり、これには1a.cリプレッサータンパク質が可逆的に結合する。

固体担体は、好適には、マイクロタイターウェル（従来の8×12形式のもの）が好ましい。この形でもディップスティック(dipstick)の形であってもよく、これらはプライマーDNAと結合するような定性化ポリスチレンで作製し得る（K. Almer, 博士論文、上立工業大学(Royal Institute of Technology)、スウェーデンストックホルム、1988)。担体は、また、例えばアガロース、セルロース、アルギン酸塩、テフロン（登録商標）又はポリスチレンなどで作られた粒子や繊維やキャピラリーであってもよい。担体は、微性材料、例えばDylen AS（ノルウェー・ノリスロ）製の超微細性ビーズなどであってもよい。

固体担体は、プライマーを結合するための、水酸基やカルボキシル基やアルデヒド基やアミノ基のような官能基又はアビジンやストレプトアビジンのような部分を含有しているもよい。これらは、酸に、かかる官能基のいずれかを有するポリマーの表面コーティングを与えるような担体を担体に固着することによって与えることができ、例えば、ポリウレタンとポリグリコールを用いて水酸基を与えたり、セルロース誘導体で水酸基を与えたり、アクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマーでカルボキシル基を与えたり、或いはアミノアルキル化ポリマーでアミノ基を与えたりすることができる。米国特許第4,654,281号には、このような表面コーティングの導入法が教示されている。

アッセイ技術は非常に迅速であり、したがって多数の試料が迅速に分析できるようなロボット装置を用いて自動化するのは簡単である。好ましい検出及び定量は比色法に基いているので、視覚的な検査だけで判定できる場合も多い。

増幅DNAは試料中のmRNAから合成されたcDNAであってもよく、本発明の方法はこうして特異的なmRNAに基づいて診断にも適用できる。このような予備増幅は逆転写酵素による下増幅処理によって行なうことができるが、好適には、後段でPCRを行なう場合にはそのPCR段階で用いる鎖伸張及び増幅の系と同じ系で行なう。PCR操作は「本鎖を解離させるための加熱処理を要するので、逆転写酵素は最初のPCRサイクルにおいて失活するはずである。mRNAが試料液である場合には、最初の試料（例えば血清試料）を固定化ポリドオリゴヌクレオチドで処理して、その末端ポリA配列を介してすべてのmRNAが回収できるようにするのが有利である。別法として、特異的なRNA配列を介してRNAを回収するために、特異的オリゴヌクレオチド配列を用いることもできる。かかるオリゴヌクレオチドは、国際特許出願PCT/EP 89/00304 (WO 89/09282)に記載されているように、後でcDNAに対するプライマーとして役立つことができる。

増幅DNAを最初に増幅する好ましい方法としてPCRについて述べてきたが、PCRと組み合わせる代わりに別の方法を用いてもよいことは当業者には明らかであろう。温度サイクリングも耐熱性ポリメラーゼも必要としない近に開発された増幅法として、自然配列複製(NCR)法がある。NCR法はレトロウイルスの複製モデルにしたもので、増幅に使用することができる（Gingras, T.R. et al. PNAS (USA) 82: 1874-1878; 並びに Gingras, T.R. et al. PCR Methods and Applications Vol.1, pp25-33 など参照）。

伸長プライマーは、標的塩基の両側で固定化鎖と逆転写ハイブリダイゼーションを成す程度に十分な長さを持つ一方、不要な化学合成を避けるためにある程度短い方が都合がよい。C-G間の結合の力が結合に與する水素結合の数が多いため、プライマーの長さ並びにハイブリダイゼーションの安定性がA-T塩基対のC-G塩基対に対する比率にある程度依存していることは当業者には明らかであろう。また、当業者であれば、当然に、伸長プライマーと増幅配列のその他の部分との相違並びにそれに伴う変性温度（ストリンジェンシー）を考慮するはずである。このようなルーチン実験についての詳細は、例

えば Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 著の Molecular Cloning: a laboratory manual (1989) などの文献に見出すことができる。伸長プライマーは試料を4つのアリコートに分れる前に加えるのが好ましいが、各々のアリコートに個別に伸長プライマーを加えてよい。伸長プライマーはPCRプライマーと同一であってもよいが、系に追加的な特異性の要求を導入するためには異なる場合も多い。

ジデオキシヌクレオチド存在下でのポリメラーゼ反応は、T7ポリメラーゼ、クレノウ又はSequence Ver. 2.0（米国US社製 Sequence Ver. 2.0は登録商標である。）などのジデオキシヌクレオチドの反応を伴うポリメラーゼを用いて行なわれる。ただし、公知の通り、多くのポリメラーゼがブルーフリーディング（脱色）特性、即ち、ユラーチェック特性を有していて、増幅に利用される3'末端の1個もしくはそれ以上のメクレオチドが酸により消化されることがある。本発明の方法でこのような消化が起こると、バックグラウンドノイズが増加する。この問題を避けるために、例えばT7ポリメラーゼやSequence Ver. 2.0のような非ブルーフリーディングポリメラーゼを使用するのが好ましい。さもなければ、ポリメラーゼによる3'末端脱色を抑制するフッ素イオン又はメクレオチドリン酸を各アリコートに加えるのが好ましい。

二本鎖DNA及び/又は非特長DNAの固定は様々な方法で行なうことができる。二本鎖DNAに関しては、鎖伸張反応の際の鎖伸張の導入などの慣用技術で可能であるが、1a.cオペレーター配列を用いるのが好ましく、この1a.cオペレーター配列は好ましくは上述の通り増幅時にDNAに鎖定する。鎖全体の伸長によって「本鎖DNA配列が生じ、これに1a.cリプレッサー-β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質が結合する。結合した融合タンパク質は上述の通り比色法で測定することができる。これによって鎖伸張の起こった3つのアリコートが判別され、残りのアリコートに加えられるジデオキシ塩基が判別する。

プライマーの伸長がジデオキシヌクレオチドでブロックされた非特長DNAに固着しても数多くの固定化が可能であり、当業者には容易に分かるであろう。好ましくは、伸長プライマーの3'末端の下流にハイブリダイズするプロンプ、即ち、

伸長プライマーのハイブリダイゼーション条件と固定化鎖の3'末端の間の固定化鎖にハイブリダイズするプローブを用いる。プローブは標識の付いているもの或いは標識を結合するための手段を有しているものが適している。このようなプローブは二本鎖DNAには結合するが、二本鎖DNAには結合しない。

所望により、二本鎖DNAと一本鎖DNAの両方を固定してもよく、そうすると結果の正確性をさらにチェックすることができる。通常は、ジデオキシヌクレオチドを含んでいない対照実験並びに4種全てのジデオキシヌクレオチドの混合物を含んだ「ゼロ対照実験」を行うのが好ましい。

もう一つの固定手段は、本発明者の同一の出発点に導く係属出願（PCT/JP93/01206（WO93/23564））に開示されている方法で、鎖伸長反応時に放出されるピロリン酸を使うというものである。各ヌクレオチドが収束される時に、ヌクレオチド三リン酸からピロリン酸が解離して、残ったヌクレオチド三リン酸が鎖伸長反応の基質に取込まれる。鎖伸長反応時にピロリン酸の放出が盛んに起こる。このようなピロリン酸の放出はルシフェリンとルシフェラーゼを用いて測定することができる。ルシフェリン/ルシフェラーゼ系はピロリン酸の存在に実質的に正比例して光を発生する。

例えば鎖伸長のキャリアーの適切な長さなどの諸所において、試料はヘテロ接合性の材料を含んでいる。即ち、DNAの半分は標識位置に一つのヌクレオチドを有しているが、もう半分は別のヌクレオチドを有している。したがって、本発明の方法に用いられる4つのアリコートのうち、2つは標識シグナルを与え、2つは非標識シグナルを与えるであろう。したがって、各試料中の放出標識量を定量的に決定するのが好ましい。ホモ接合性試料の場合には、4つのアリコートのうち、3つが標識で1つが非標識シグナルを与えることは明らかであろう。

好ましくは、本発明は、出願人の同一の出発点に導く係属出願（PCT/JP93/01204（WO93/23563））に開示されている発明と組合わせる。この係属出願に教示された発明では、PCRを用いて、問題とするDNA配列の3'末端部に永久に結合したプライマーを与えるようなループ構造を導入する。

例えば、このような修正法では、二本鎖DNAのうちの標識位置を含んでいる鎖の標識配列上に伸長プライマーを3'末端ループ構造の一端として組み込む。この標識配列はその3'末端部に領域Aを有しており、場合によってはその領域Aからさらに3'側に伸びたりDNA領域Bが存在しており、上記標識配列に相補的な配列の3'末端部にハイブリダイズする第二のプライマーであって固相媒体上に固定化されているか又は固相媒体に結合させるための手段を与えられている第一のプライマーと、上記標識配列のA及び/又はBの少なくとも一部分にハイブリダイズする3'末端配列を有してかつその5'末端にはAと実質的に同一の配列を有する第二のプライマーとも使用したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅反応に上記二本鎖DNAを付す。この増幅反応によって、標識配列の3'末端に、領域A・ループを形成し得る領域・序列Aに相補的な配列A'を以上の順序で有する二本鎖標識DNAを生じさせる。しかる後に、増幅二本鎖DNAを固定化基で二本鎖解離基に付して、そうすることにより、固定化されていない標識鎖を遊離させ、領域A'を領域Aに自然に成り込め人為的にハイブリダイズさせてループを形成させる。領域A'の3'末端は標識位置のすぐ隣にハイブリダイズする。ジデオキシ反応及び伸長反応では上記のハイブリダイズした部分をプライマーとして用いる。標識位置に組み込まれた塩基などのような方法で固定してもよいが、好ましくは、上記の塩基中の塩基PCT/JP93/01205（WO93/23564）に開示されているピロリン酸の放出による方法で固定する。

本発明は、また、通常は少なくとも以下の構成成分：

- (a) その検査に於いて伸長プライマーであって、標識位置がそのプライマーの3'末端のすぐ隣になるように試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマー；
- (b) ポリメラーゼ；
- (c) ジデオキシヌクレオチドとデオキシヌクレオチド；及び
- (d) 任意成分としての固相媒体

を含むキットを包含する。

このキットを一次PCR増幅法で使用する場合には、キットは通常は少なくと

も以下の構成成分：

- (i) 少なくとも一方のプライマーがそのプライマーを固定化するための手段を有している一对のPCR用プライマー；
- (ii) ポリメラーゼ、好ましくはTaqポリメラーゼのような耐熱性のポリメラーゼ；
- (iii) PCR反応用の緩衝液；及び
- (iv) デオキシヌクレオチド

も含んでいる。

酵素標識を使用する場合には、キットはその酵素の性質と検出系のその他の成分を含んでいるのが都合がよい。

好ましくは、上記プライマー片の一方はそのプライマーを固定化するための手段とタンパク質の結合する配列を共に含んでいる。好ましい形のプライマーは、（例えばストレプトアビジン-抗磁性ビーズへの）固定化用の手段として機能するビオチンと、標識用の手段としてのルビオレターを含んでなる。上記のタイプの好ましいプライマーを用いて本発明を実施するためのキットは、1又は2リブレッサータンパク質と結合した酵素標識を含んでいるのが好ましく、好ましい酵素標識はβ-ガラクトシダーゼである。

以下、図面を参照しながら非限定的な実施例により本発明を説明するが、図面について説明すると、

図1は、本発明の方法を用いて1対の標識位置の塩基を固定するためのプロトコルを示したものであり、

図2は、実施例1で用いたオリゴヌクレオチドプライマーと増幅用の試料DNAと共に示したものであり、

図3は、実施例で用いた別のオリゴヌクレオチドプライマーと試料DNAと共に示したものであり、そして

図4は、本発明の方法の実施例で得られた結果を示すグラフである。

材料と方法

細菌株及び培養

大腸菌 (*Escherichia coli*) RR1ΔM15株 (Rüther, U. (1982) "pUR 250 which allows rapid chemical sequencing of both strands of its inserts" *Nucl. Acids Res.*, 10, 5765-5772) を細菌ホストとして使用した。使用したプラスミドベクターはpRIT28 (Huthman, T., Siehl, S., Moka, T. and Uhlen, M. (1988) "Approaches to solid phase DNA sequencing" *Nucleosides & Nucleotides* 7, 619-638) であった。

オリゴヌクレオチドの合成

HIV-1逆転写酵素遺伝子 (RT) の活性部位の一部をコードする領域 (塩基 625-1165; Myers, G., Kerber, B., Berkovsky, J.A., Smith, R.F. and Pavlakis, G.N., *Human Retroviruses and AIDS 1991* (Los Alamos National Laboratory, New Mexico 1991)) に相補的な7種類のオリゴヌクレオチドプライマー: RIT135, RIT321, RIT122, RIT331, RIT332及びRIT333 (図2, 図3参照) を、自動DNA合成装置 (スウェーデンのKABI-Pharmacia社製のGene Assembler Plus (登録商標)) によって製造業者の演明書通りホスホラミダイト化学により合成した。RIT332はデオキシホスホラミダイト (米国カリフォルニア州のClontech社製) を用いてビオチン化した。精製はpепRPC 5/5逆転写カラム (スウェーデンのKABI-Pharmacia社製) を用いて行なった。

酵素及びスクリーニング

各種制限酵素、T4 DNAリガーゼ (KABI-Pharmacia社製、スウェーデン)、T7 DNAポリメラーゼ (KABI-Pharmacia社製、スウェーデン)、Taq DNAポリメラーゼ (米国カリフォルニア州のCetus社製) 及びSequenase ver. 2.0 (米国USB社製, Sequenaseは登録商標) は業者の指示にしたがって使用した。デオキシヌクレオチド及びジデオキシヌクレオチドはドイツのBoehringer Mannheim社から入手した。

PCR反応のモニタリング

HIV-1の患者から得られた臨床試料 (スウェーデンストックホルムのスウェーデン細菌学研究所 (Swedish Bacteriology Laboratory; SBL)) から、各5

pmolのオリゴヌクレオチドRIT331とRIT333(図3)を用いた増幅によってHIV RTフラグメントをクローニングした。RIT331とRIT333は共に、上面HamHI及び下面EcoRI認識部位を有するための「ハンドル」部を含んでいた。PCR反応液は、200μMの各dNTP、20mMのTris-HCl(pH8.7)、2mMのMgCl₂、0.1%のTween 20及び0.5ユニットのAmpliTaqを含んでいて、最終容積は50μlとした。温度プロファイルは、95℃で0.5分間の変性段階、次いで55℃で0.5分間のプライマー・アニリング段階、及び72℃で2分間の伸長段階にセットした。これらの段階を、Gene Amp PCR System PE 9600 (Perkin-Elmer社製、米国カリフォルニア州)を用いて30回繰り返した。こうしてPCR増幅したHIV RTフラグメント及びベクターpRIT28と共にHamHIとEcoRIで制限し、アガロースから切り出して増幅した後、室温で1時間遊離状態を行なった。この構築物でコンピダントRRIΔM15細胞を感染転染し、青/白選択(Langley, E.K., Villarejo, M. R., Fowler, A.V., Zamboni, P.J. and Zubin, I. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1234-1237)ができるようにIPTG (n-インプロピル-β-D-チオガラクトシド)ラシド)、X-gal (5-ブromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-ガラクトシド)及びアンピシリンを含んだBAB(前出の Sambrook, J. and Maniatis, T. (1989)の文献)平板上に感染転染した。菌相選択法(Hutman, T., Bergh, S., Moks, T. and Uhlen, M. (1991) "Bidirectional solid-phase sequencing of in vitro-amplified plasmid DNA" Dig. Techniques 11, 64-92)により、5つの白コロニーが正しいインサートをもつプラスミドであることを確認した。これらのコロニーのうちの1つをRIT28-Tと名付け、以降の研究用として選んだ。このコロニーはスウェーデン/オーストリアホルムスの工業大学化学学科に保存してある。

DIANA検出ミニシーケンシング法装置の調製

pRIT28-Tを含むコロニーをバイアルに移して、10μlの20mM Tris-HCl(pH8.7)中で98℃で5分間加熱した。次いで1μlの溶

液を、50pmolのRIT135及びRIT322(ビオニン化)、0.25pmolのRIT321、200μMの各dNTP、20mMのTris-HCl(pH8.7)、2mMのMgCl₂、0.1%のTween 20及び0.5ユニットのAmpliTaqのPCR液に移して、最終容積を50μlとした。プライマー-RIT322は、後段でスレブ・アビジン複合体に結合させるための5' ビオチンと、AccOP認識部位を有する21塩基とからなる。塩基を1塩基の読み行ない、得られたPCR生成物を、次に、予備洗浄スレブ・アビジン複合体磁柱ビーズ(Lea, T., Vardak, F., Kustad, K. et al. (1988) "Monosized, magnetic polymer particles and their use in separation of cells and subcellular components and in the study of lymphocyte function in situ" Journal of Molecular Recognition 1, 9-15)、より、製造業者の推奨する結合液で予備洗浄しておいたDynabeads M280ストロンブアビジン(ノルウエーのDynal AS社製、Dynabeadsは登録商標)上に固定化した(Hutman, T., Stahl, S., Horvath, B. and Uhlen, M. (1987) "Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support" Nucl. Acids Res. 15, 4937-4946)、順次増幅液、ビーズを50μlの結合/洗浄液で洗って、結合DNAをアッセイした。DNAの固定化されたビーズを50μlの融合タンパク質100μl-β-ガラクトシダーゼ(ノルウエーのDynal AS社製)と混合し、20分間インキュベートした。ビーズをDANA緩衝液(ノルウエーのDynal AS社製)で4回洗浄して過剰の融合タンパク質を除去し、塩の濃度によるバックグラウンドを排除するために最終段階で新しいコロニーに変えた。100μlのn-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシド(ONPG, 1.25mg/ml)を発色基質として加え、そして6分後に100μlの1M Na₂CO₃を加えて反応を停止した。上清の405nmの吸収度をEAR340AT ELISAプレートリーダー(SLT-Lab Instruments, オーストリア)で測定して分析した。20μlの0.1M NaOHと5分間インキュベートして磁柱によりニトロを分解させて、一本鎖固定化DNA型をエッジさせ、これを再度50μlの結合液、50μlの1M TEで洗浄した。1pmolのRIT332(図

2)を用い、8mM MgCl₂及び20mM Tris-HCl(pH7.5)中で容積を13μlとして、65℃に5分間加熱して次に室温に10分間静置することによって、プライマーのアニリングを行なった。

ミニシーケンシング反応

適合ジデオキシヌクレオチドに関して、8つの別個の伸長反応(1つはddATPのみで、1つはddCTPのみで、1つはddGTPのみで、1つはddTTPのみで、1つは4種類すべてのddNTPと共に、1つはddNTPを全く加えずに)は、2μlのアニリング液、17mM Tris-HCl(pH7.5)、6mM MgCl₂、1mM DTT、1μMの適合ジデオキシヌクレオチド及び0.13ユニットのSequenase Ver 2.0 (Sequenaseは登録商標)を含んだ全量10μlの中で行なった。この実験の概略図を図1に示す。ジデオキシ取り込み反応は室温で5分間行ない、20μlの0.5M EDTAの添加により停止させた。しかる後に、ビーズを30μlの10mM Tris-HCl(pH7.5)で2回洗浄した。次の伸長段階では、200μMのdNTP溶液を使用し、25mMのTris-HCl(pH7.5)、12.5mMのMgCl₂、1mMのDTT及び0.13ユニットのSequenase(登録商標)と共に全量を10μlとした。ジデオキシヌクレオチドが検出されないアリコトでは、Sequenase(登録商標)による鎖の伸長が起こって、完全な鎖長の二本鎖DNAがビーズに結合するようになる。室温で5分間インキュベーションした後、20μlの0.5M EDTAを加え、ビーズを40μlのDANA緩衝液(ノルウエーのDynal AS社製)(0.1M Tris-HCl(pH7.5)、0.15M NaCl、0.1% Tween 20、1mM MgCl₂、及び10mM β-メルカプトエタノール)で洗浄した。

DIANAによる検出

結果はDIANA法(Wahlberg, J., Lundberg, J., Hutman, T. and Uhlen, M. (1990) "General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid-phase genomic sequencing of the positive samples" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 6569-6573)で検出した。DNAの固定化されたビーズを50μlの融合タンパク質1

00μl-β-ガラクトシダーゼ(ノルウエーのDynal AS社製)と混合し、20分間インキュベートした。ビーズをDANA緩衝液(ノルウエーのDynal AS社製)で4回洗浄して過剰の融合タンパク質を除去し、塩の濃度によるバックグラウンドを排除するために最終段階で新しいコロニーに変えた。100μlのn-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシド(ONPG, 1.25mg/ml)を発色基質として加え、そして6分後に100μlの1M Na₂CO₃を加えて反応を停止した。上清の405nmの吸収度をEAR340AT ELISAプレートリーダー(SLT-Lab Instruments, オーストリア)で測定して分析した。その結果を図4に示す。このアッセイで、4種類すべてのジデオキシヌクレオチド(ddNTP)を使用した場合とddATPのみを使用した場合に低いシグナルが得られた。配列決定用プライマーの3' 末端の次の相補塩基はジデオキシシミンであるので、上記の結果は、このアッセイ法を使用してある特定の場所の塩基配列を検出することができることを示している。

実施例2

菌型の調製

AZ菌性を示す血から得たHIV感染転染液をフラグメント(Petersen, H. et al. 未発表データ)を、RIT331とRIT333のプライマーを用いて、ベクターpRIT28にPCRクローニングした。大腸菌RRIΔM15株を培養転染して、青/白選択法(前出の Langley, E.K. et al. (1975))を用いて選択した。細菌コロニーを99℃の20mM Tris-HCl(pH8.7)10μl中で5分間加熱して、PCR増幅を行なった。次に、1μlの溶菌液を、5pmolのプライマーセットA、200μMの各dNTP、20mMのTris-HCl(pH8.7)、3mMのMgCl₂、0.1%のTween 20(Tweenは登録商標)及び0.5ユニットのAmpliTaq DNAポリメラーゼ(米国カリフォルニア州のCetus社製)に加えて、最終容積を50μlとした。温度プロファイルは、95℃での0.5分間の変性段階、70℃での1.5分間のアニリング/伸長段階が含まれており、これらの段階を30回繰り返した。上述の細菌コロニーの培養並びに上記反応液には、Gene Amp PCR

System 9600 (Perkin-Elmer社製、米国カリフォルニア州)を用いた。PCR生成物を、ストレプトアビジンの共有結合した磁気ビーズ(前出の *Lea T. (1988)*)であるDynabeads M280 (Dynabeadsは登録商標)上に固定化した。ビーズは製造業者(ノルウェーのDynal AS社)の使用説明書通りに使用した。固定化PCR生成物を0.10M NaOH中で10分インキュベートした後、上清を除去することにより、一本鎖DNAを得た。固定化一本鎖DNAを、50 μ lの10mM Tris-Cl(pH 7.5)、1mMEDTA、2M NaClで洗浄し、次いで50 μ lの10mM Tris-Cl(pH 7.5)で洗浄した。洗浄後、20mMのTris-Cl(pH 7.5)、8mMのMgCl₂及び1pmol/lの配列決定用プライマーを加えて全量を13 μ lとした。混合液を65℃で5分間インキュベートした後、室温に冷却した。

ミニシーケンシング

ジデオキシスクレオチド鎖込み反応は、塩酸性ビーズ上に固定化された鎖型/プライマー-フラグメント1 μ l (50 μ l PCR増幅反応液の1/13)と、0.13ユニットのSequenase version 2.0 (米国のUnited States Biochemical社製、Sequenaseは登録商標)と、0.5 μ lの10 μ M ddNTP (1種類)と、さらに2.5mM Tris-Cl(pH 7.5)、12.5mM MgCl₂、2.5mM DTTを含む緩衝液とからなる全量で10 μ lの混合液で行なった。室温で5分間インキュベートした後、ビーズを、50 μ lの10mM Tris-Cl(pH 7.5)、1mMEDTA、2M NaCl、1% Tween 20で洗浄し、次いで50 μ lの10mM Tris-Cl(pH 7.5)、1mMEDTA、2M NaClで洗浄し、最後に50 μ lの10mM Tris-Cl(pH 7.5)で洗浄した。10mM Tris-Cl(pH 7.5)で容積を5 μ lに調整した。対照フラグメントはddNTP非存在下で、ゼロ対照フラグメントは全種類のddNTP存在下で、DNAポリメラーゼとインキュベートした。これら様々な試料を次にELIDAで分析した。

ELIDA

上記のミニシーケンシングの各ブレインキュベーション試料が完全なプライマー伸長をするか否かについてELIDA法でアッセイした。このアッセイは、LB 1250ルミノメーターと電位差記録計を用いて行なった。ルミノメーターは内部標準光に対するレスポンスが10mVとなるように校正した。発光出力は既知量のATPをpp1を加えて校正した。反応は室温で行なった。標準アッセイ容積は0.2mlであり、以下の成分: 0.1M Tris-塩酸(pH 7.75)、2mMEDTA、10mM 酢酸マグネシウム、0.1% BSA、1mM DTT、0.4mg/ml ポリビニルピロリドン360000、2 μ M dNTP、100mg/ml D-ルシフェリン (BioOrbit社製、フィンランド)、4 μ g/ml L-ルシフェリン (BioOrbit社製、フィンランド)、0.3ユニット/ml ATP依存性ルシフェラーゼ (Sigma、米国)及び精製ルシフェラーゼ標本 (Enzymatic, 英国)を含んでいた。使用したルシフェラーゼの量は、容積1mlで100pmolのATPに対して1Vのレスポンスを与えるものであった。5分間のブレインキュベーションの後、アデノシン 5'-ホスホ硫酸とNaFとdNMPとをそれぞれ最終濃度が2 μ M、5mM、0.4mMとなるように加えた。ジデオキシ鎖込み試料から分取した5 μ lの鎖型/プライマー-フラグメントを添加した後、0.13ユニットのSequenase (登録商標)を添加して反応を開始した。反応は5分以内に完了した。

結果

ミニシーケンシング法の原理

ミニシーケンシング法の原理を図1に概略図として示す。この図では、増幅Tの存在の有無を検出している。既知とする特定DNAフラグメントを、プライマー-対の一方が5'末端がピオニ化されているようなPCR法で増幅する。PCR増幅した既知のDNA断片をストレプトアビジンの共有結合した磁性ビーズ上に固定化し、次いでNaOHで洗浄して一本鎖形に変換し、この一本鎖DNAに1種類のプライマーをアニールする。既知/プライマー-フラグメントを次に4

つの異なるアリコートに分割し、これらをポリメラーゼ存在下にて4種類のddNTPのそれぞれに逐次添加する。反応後、得られたフラグメントを洗浄して、4種類のすべてのddNTPの存在するプライマー伸長反応の基質として用いる(図1参照)。DNA増幅反応の進行をELIDA法でモニターする。最初の反応においてジデオキシスクレオチドが鎖込まれると、次の「追跡」反応の際にピロリン酸の生成が阻害される。同時に、ジデオキシスクレオチドの鎖込みが妨げられていないければ、「追跡」反応時にピロリン酸が頻りに放出されて、ELIDA反応により発光する。このELIDAの結果から、プライマーの後に位置する最初の塩基が容易に推定される。4種類のすべてのddNTPと共にインキュベートする塩性対照並びにddNTPの非存在下でDNAポリメラーゼとインキュベートする塩性対照を含めてもよい。

特定DNAのミニシーケンシング

あるddNTPの鎖込みは、ポリメラーゼ反応時にそれと特異的なジデオキシスクレオチド(ddNTP)が存在した場合にのみ検出された。用いた条件下では、非相補塩基の鎖込みに全く阻害されなかった。「追跡」反応の際には、非相補塩基とインキュベートした場合のみ、pp1の生成がELIDA法で検出された。相補塩基が鎖込まれた場合には、フリーな3'OH基を欠いているのでDNAの伸長は不可能であった。ddNTP 3塩基を含む混合液を4種類異なるDNAフラグメント(最初の幾何において)をインキュベートした場合にも同じ結果が得られた(データは示さず)。正確な結果を得るためにはニキソスクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼを使用しなければならぬ点を強調しておくが、ある種のポリメラーゼのエキソスクレアーゼ活性が例えばフッ素イオンなどによって抑制できることが知られている。非相補塩基の鎖込みを抑制するために低濃度(0.05~5 μ M)のメクレオチドを使用することも効果的である。

感度

上記で紹介した実験では50 μ lのPCR増幅反応液の1/13をELIDA試験に使用した。しかし、使用量はこれより少なくても多くてもよい。181塩基長のDNAフラグメントのプライマー伸長反応の際のpp1生成の初速度と生

成量をDNA濃度の関数として求めた。ELIDAにおけるpp1生成の初速度と生成量は共に、(50 μ lのPCR増幅反応液の1/130から2/13まで)

一定範囲で試験したDNA濃度に比例する。アッセイ時のシグナルを増大させるために、DNAの量をさらに増やしてもよいし、固体試料の結合容量を増やしてもよい。このアッセイ(全量200 μ l)の上限はpp1生成量200pmolである。下限は、主として、使用したDNAフラグメントの鎖長(シグナルはプライマー伸長反応時に製造されるメクレオチドの量に比例するため)、用いた塩基、並びに異なる倍率に導入した夾雑pp1、によって決まる。後者の二つの因子は所望により修正することができる。

請求の範囲

1. DNA配列のある標的位置の塩基を特定する方法にして、試料DNAを増幅適量に付し、その増幅DNAを固定化した後で二本鎖解離処理に付して、非固定化鎖を取り除き、標的位置の両側で固定化DNAにハイブリダイズするよう伸長プライマーをええ；固定化された一本鎖DNAの4つのアリコートの各々を1種類のジデオキシヌクレオチド存在下でのポリメラーゼ反応に付し、その際、各アリコートについて異なるジデオキシヌクレオチドを用いて標的位置の塩基に相補的なジデオキシヌクレオチドだけが導入されるようにしておき；次に、4つのアリコートを4個頭すべてのデオキシヌクレオチドの存在下での伸長反応に付して、各アリコートにおいてジデオキシヌクレオチドと反応していないDNAが伸長して二本鎖DNAを形成する一方、ジデオキシヌクレオチドでブロックされたDNAは非伸長鎖DNAとして残るようにしておき；しかる後に、二本鎖及び／又は非伸長鎖DNAの固定を行なつて、どのジデオキシヌクレオチドが導入されていて、したがってどの塩基が標的位置に存在しているかを明らかにすることを特徴とする方法。
2. 請求項1記載の方法にして、固定化されているか或いは固定化中半分の間わっている第一のプライマーを用いるインデント増幅反応によって、試料DNAを増幅することを特徴とする方法。
3. 請求項2記載の方法にして、前記第一のプライマーが、既知長さDNA結合タンパク質に対する認識部位を二本鎖形成のときに含んでいる領域を有していて、伸長反応による二本鎖DNAの形成を上記認識タンパク質への結合によって測定することとを特徴とする方法。
4. 請求項2又は請求項3記載の方法にして、前記第一のプライマーが固定化用手段としてビオチンを付することを特徴とする方法。
5. 請求項2～請求項4のいずれか1項記載の方法にして、前記インデント増幅に、前記標的DNAの3'末端側の領域A及び／又はその領域Aからさらに3'側に附じた領域Bにハイブリダイズする第二のプライマーであつて、

上記標的配列の領域A及び／又はBの少なくとも一相介にハイブリダイズする3'末端配列を付していかつその3'末端にはAと実質的に同一の配列を有する第二のプライマーを使用し、この増幅処理によって、標的配列の3'末端に、領域A、ループを形成し得る領域、及び配列Aに相補的な配列A'を以上の順序で有する二本鎖標的DNAを生じさせ、しかる後に、増幅二本鎖DNAを固定化形で二本鎖解離処理に付して、そうすることによって固定化されていない標的鎖を遊離させて、領域A'を領域Aに自然に成いは人為的にハイブリダイズさせてループを形成させることを特徴とする方法。

6. 請求項1～請求項5のいずれか1項記載の方法にして、二本鎖DNAの形成を、伸長反応中に放出されたピロリン酸の検出又は検出によって測定することを特徴とする方法。
7. 請求項8記載の方法にして、発光をピロリン酸のインジケータースとして検出するルシフェリン／ルシフェラーゼ反応によって、ピロリン酸を検出又は検出することを特徴とする方法。
8. 請求項1記載の方法を実施するためのキットにして、少なくとも以下の構成成分：
 - (a) その検出に特異的な伸長プライマーであつて、前記標的位置がそのプライマーの3'末端の両側に附になるように試料DNAにハイブリダイズする伸長プライマー；
 - (b) ポリメラーゼ；
 - (c) ジデオキシヌクレオチドとデオキシヌクレオチド；及び
 - (d) 生成成分としての阻害剤
 を含んでなることを特徴とするキット。
9. 請求項8記載のキットにして、さらに少なくとも以下の構成成分：
 - (i) 少なくとも一方のプライマーがそのプライマーを固定化するための手段を有している一方のドに用いるプライマー；
 - (ii) ポリメラーゼ、或はしくは請求項1ポリメラーゼのような耐熱性のポリメラーゼ；

(iii) PCR反応用の緩衝液；及び

(iv) デオキシヌクレオチド

をも含んでいることを特徴とするキット。